(19)日本国特許庁(JP)　(12)特 許 公 報(B2)　(11)特許番号
特許第5241518号
(P5241518)
(45)発行日 平成25年7月17日(2013.7.17)　(24)登録日 平成25年4月12日(2013.4.12)

(51)Int.Cl.		F I		
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	D
A61P 11/00	(2006.01)	A61K	39/395	N
C07K 16/18	(2006.01)	A61P	11/00	
		C07K	16/18	ZNA

請求項の数 6 (全 39 頁)

(21)出願番号 特願2008-558149(P2008-558149)
(86)(22)出願日 平成20年2月15日(2008.2.15)
(86)国際出願番号 PCT/JP2008/052526
(87)国際公開番号 WO2008/099920
(87)国際公開日 平成20年8月21日(2008.8.21)
審査請求日 平成23年2月14日(2011.2.14)
(31)優先権主張番号 特願2007-34293(P2007-34293)
(32)優先日 平成19年2月15日(2007.2.15)
(33)優先権主張国 日本国(JP)

(73)特許権者 504145342
国立大学法人九州大学
福岡県福岡市東区箱崎六丁目１０番１号
(73)特許権者 504258527
国立大学法人 鹿児島大学
鹿児島県鹿児島市郡元一丁目２１番２４号
(73)特許権者 000131474
株式会社シノテスト
東京都千代田区神田神保町一丁目５６番地
(74)代理人 100102978
弁理士 清水 初志
(74)代理人 100102118
弁理士 春名 雅夫
(74)代理人 100160923
弁理士 山口 裕孝
最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗ＨＭＧＢ－１抗体を含む間質性肺疾患治療剤

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
抗ハイモビリティーグループボックスプロテイン1(HMGB-1)抗体を含む間質性肺疾患治療剤であって、抗HMGB-1抗体が配列番号:1のペプチドを認識することを特徴とする治療剤。
【請求項２】
間質性肺疾患が間質性肺炎である、請求項1に記載の治療剤。
【請求項３】
間質性肺炎に起因する体重減少を阻害する、請求項2に記載の治療剤。
【請求項４】
間質性肺炎に起因する線維化を阻害する、請求項2に記載の治療剤。
【請求項５】
抗HMGB-1抗体が、ハイモビリティーグループボックスプロテイン2 (HMGB-2)よりもHMGB-1に強く結合することを特徴とする、請求項1から４いずれかに記載の治療剤。
【請求項６】
抗HMGB-1抗体が、HMGB-2に結合しないことを特徴とする、請求項1から４いずれかに記載の治療剤。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】

本発明は、ハイモビリティーグループボックスプロテイン1(HMGB-1)に対する抗体を活性成分として含有する間質性肺疾患を治療または予防するための製剤に関する。

【背景技術】

【０００２】

哺乳動物の肺は、億単位からなる直径数ミクロンの肺胞により構成された非常に目の細かいスポンジ状の組織であり、吸い込まれた空気は、気管支を通り各肺胞へと届けられる。この肺胞の周りの非常に薄い壁の部分は、間質と呼ばれ、全身の細胞へ供給される酸素を吸収する毛細血管が網目状に張りめぐらされている。この肺胞の壁である間質部分で炎症が起きる疾患は、総称して「間質性肺疾患」と呼ばれる。中でも、線維化を起こし易い疾患は、「間質性肺炎」と総称される。間質性肺炎のうち発生原因の不明な特発性間質性肺炎は、国により難治疾患(特定疾患)として指定されており、その発病率は、一般的に10万人に5人程度と言われている。間質性肺炎においては、症状の進行により肺胞壁が厚くなり、肺胞の形が不規則になると共に、肺全体もやや固くなる。そのため、肺の膨張が妨げられ、肺活量が落ちると同時に、酸素の吸収効率が低下し、主として呼吸困難、咳等の症状が表れる他、食欲不振、体重低下、疲労、虚弱、漠然とした胸部痛等が通常認められる。さらに進行すると、肺が繊維性成分の固まりとなり、線維化した部分においては肺としての機能が失われてしまう。

【０００３】

間質性肺炎は、組織学的に1)通常型間質性肺炎(Usual Interstitial Pneumonia; UIP)、2)剥離性間質性肺炎(Desquamative Interstitial Pneumonia; DIP)、3)分類不能な間質性肺炎(Non-Specific Interstitial Pneumonia; NSIP)、及び4)急性間質性肺炎(Acute Interstitial Pneumonia; AIP)に分類される。さらにDIPと関連していると考えられている、喫煙との強い相関性が知られる呼吸細気管支関連間質性肺炎(Respiratory Bronchiolitis-associated Interstitial Lung Disease; RB-ILD)もまた、間質性肺炎に分類される。また、原因不明の線維化肺胞炎としても知られる特発性肺線維症(Ideopathic Pulmonary Fibrosis; IPF)も、間質性肺炎に属する慢性線維化間質性肺炎であり、組織学的にはUIPと関連している。IPFについては、現在のところ、コルチコステロイド、シクロフォスファミド、及びアザチオプリン等の抗炎症剤、並びに、コルヒチン、ペニシラミン、パーフェニドン、及びインターフェロンγ等の抗線維化剤が処置されることが多いが、そのどちらもIPF患者の生存率、及び疾病の進行を改善するものではなく、肺移植以外に特に有効な治療方法がないのが実情である。(非特許文献1)

【０００４】

ハイモビリティーグループボックスプロテイン（High Mobility Group Box Protein; HMGBまたはHigh Mobility Group Protein; HMG）は、クロマチン構造に含まれる大量の非ヒストンタンパク質として1964年に発見された。HMGBはすべての高等動植物に普遍的に含まれるタンパク質であり、種族間で一次構造の保存性は極めて高い。本発明者らが、遺伝情報処理ソフトウェア「GENETYX」（SOFTWARE DEVELOPMENT社）を使用してアミノ酸配列の相同性の解析を行ったところ、ヒトのHMGB-1に対して、ウシHMGB-1の相同性は98.6%であり、ブタHMGB-1の相同性は99.1%であった。また、ヒトのHMGB-1に対して、ヒトのHMGB-2の相同性は81.2%であり、ウシHMGB-2の相同性は72.3%であり、ブタのHMGB-2の相同性は79.4%であった。

【０００５】

また、HMGB-1は核内ばかりではなく、細胞質内にも豊富に存在することが分かっている。HMGBの正確な生理作用は未だ不明であるが、DNAと結合する際に、DNAの二重螺旋構造を緩めることから、転写反応の際にDNAの高次構造を最適構造に変化させて転写活性を高めるという、極めて広範囲の転写促進因子及びヌクレオソーム弛緩因子として機能すると考えられている。

【０００６】

何種類かのHMGBの存在が明らかにされている。例えば、ハイモビリティーグループボックスプロテイン-1（HMGB-1またはHMG-1）、ハイモビリティーグループボックスプロテイ

ン-2（HMGB-2またはHMG-2）、ハイモビリティーグループプロテイン-3（HMG-3）、ハイモビリティーグループプロテイン-8（HMG-8）、ハイモビリティーグループプロテイン-17（HMG-17）、ハイモビリティーグループプロテイン-I（HMG-I）、ハイモビリティーグループプロテイン-Y（HMG-Y）、ハイモビリティーグループプロテイン-I（Y）（HMG-I（Y））、ハイモビリティーグループプロテイン　I-C（HMG　I-C）等が知られている。

【０００７】

HMGB-1は、Hox及びPOU等の核ホルモンレセプターファミリー等のタンパク質のDNAとの結合を助け、幾つかの遺伝子の発現を促進することが報告されている(非特許文献2)。また、HMGB-1のC末端ドメイン及びAボックスが、p53を介した転写活性化、及びp53依存性のアポトーシスを増幅するのに必須であることも報告されている(非特許文献3)。さらには、従来考えられていた転写因子様タンパク質としての機能に加えて、HMGB-1は、サイトカイン様分子としても機能すると考えられている。HMGB-1は全ての哺乳動物細胞の核中に存在しており、壊死細胞より放出される他、活性化されたマクロファージ、樹状細胞、及びナチュラルキラー細胞により活発に分泌されている(非特許文献4)。HMGB-1受容体には、後期糖化反応生成物受容体(Receptor for Advanced Glycation Products; RAGE)、Toll様受容体2(Toll-like receptor 2; TLR2)及びTLR4が含まれる(非特許文献5)。そのため、HMGB-1は、種々の細胞及び組織における感染、組織傷害、炎症、アポトーシス、及び免疫反応を含む多数の反応に関与している(非特許文献4)。

【０００８】

HMGB-1は、マウスにおける敗血症を伴う肺損傷の進展、及び敗血症患者において重要な役割を果たしていることが知られている(非特許文献6)。より詳細には、ワングらは1999年に、HMGB-1自体を免疫原として調製したポリクローナル抗体を使用したウエスタンブロット法により、初めて血清中（血液中）のHMGB-1の定量測定を行い、HMGB-1が敗血症のマーカーとなりうることを示した。そして、敗血症の患者において、生き残る患者と、死に至る患者を判別することが、精密に血液中のHMGB-1を測定することによって可能であることを示した。即ち、ただ単に血液中でのHMGB-1の存在を確認するだけではなく、その量を精密に定量することの有用性が明らかにされた。また、この中でラットのモデル動物実験により、HMGB-1を抗体でトラップすることによって敗血症を起こしたラットで生存率が改善するなど、HMGB-1が敗血症のマーカーとなるだけではなく、メデイエーターつまり原因物質としてかかわっている可能性が示唆されていることは非常に重要である。（非特許文献6）

【０００９】

HMGB-1の対応する受容体への結合は、上皮細胞を活性化して接着分子を増幅し、腫瘍壊死因子α(TNFα)及びインターロイキン1β(IL-1β)を放出するようマクロファージを活性化し、続いて炎症を増幅する。炎症の初期メディエーターであるTNFα及びIL-1βとは異なり、HMGB-1は、敗血症に伴う肺損傷の後期メディエーターであり、患者の予後と関連している(非特許文献7)。

【００１０】

以上のように、HMGB-1は、急性肺損傷の病理における重要な分子として認識されているのにも拘らず、その慢性肺疾患、特に肺線維症の進展における役割は、ほとんど知られていない。

【００１１】

一方、トレーシーらは、HMGB-1のN末端オリゴペプチドに対するポリクローナル抗体を敗血症等の炎症性サイトカインカスケードの活性化を特徴とする疾患の治療に用いることを提案している(特許文献1及び2)。しかし、トレーシーらにより出願されたこの特許文献中には、敗血症についてはいくつかのデータが示されているが、それ以外の列挙される疾患については、HMGB-1が生体内に出現しているかどうかさえも確認されておらず、ましてやHMGB-1に対する抗体の投与が疾患の改善につながるかどうかについては全く不明である。その後、HMGB-1がモデル実験(動物、細胞培養)及びヒト検体を使ってリウマチ、ARDSなどで生体中に出現している可能性が示唆されているが、HMGB-1が原因物質であるかどうか

は不明である。

【００１２】

その他、抗HMGB-1抗体を炎症反応等の免疫応答を抑制するために使用することが多数の特許文献において提案されており（特許文献3～6）、敗血症への投与効果を調べたものも見受けられるが、それ以外の列挙される疾患については、HMGB-1が生体内に出現しているかどうかさえも確認されておらず、ましてやHMGB-1に対する抗体の投与が疾患の改善につながるかどうかについては全く不明である。

【００１３】

HMGB-1に対する抗体を作製する場合の非常に大きな特徴として、治療剤として有用であるような、親和性の高い抗体を作製することは容易なことではないことが挙げられる。通常、目的抗原に対する抗体を調製する場合には、目的の抗原を、飼育し易い動物(ブタ、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、マウス、ラット等)に免疫する。免疫する際には、親和性のよい抗体が誘導されるよう、アジュバントを用いる等、多くの場合種々の工夫がなされる。しかしながら、動物に免疫すること自体が、免疫を受ける動物にとってはストレスであり、さらにより親和性の高い抗体誘導のための操作は、動物に非常に大きなストレスをもたらし、免疫された動物において炎症反応を誘導してしまう。このように炎症反応が誘導されてしまうと、免疫を受けた動物の体内に自身のHMGB-1が誘導される。ここで、HMGB-1の他の蛋白質とは異なる特徴が非常に大きな問題となる。それはHMGB-1の動物種間のホモロジーが、非常に高いということである。例えば、ヒトと比較した場合、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、マウス、ラットのHMGB-1の一次構造はアミノ酸レベルで2～3残基しか異ならない。これは、つまり、ヒトHMGB-1をこれらの動物に免疫した場合、動物の体内で誘導された親和性の高い抗体が、その動物のHMGB-1に吸収されてしまい、実際に得られる抗体は、親和性の低い、質の悪い抗体となってしまうという現象が起こりうることを示す。

【特許文献１】米国特許第6,468,533号公報
【特許文献２】米国特許第6,448,223号公報
【特許文献３】特表2005-512507号公報
【特許文献４】特表2005-508913号公報
【特許文献５】国際特許公開第2004/044001号パンフレット
【特許文献６】国際特許公開第2005/026209号パンフレット
【非特許文献１】Abdelaziz MM et al., Respirology (2005) 10: 284-9
【非特許文献２】Lotze MT and Tracey KJ, Nat Rev Immunol (2005) 5: 331-42
【非特許文献３】Banerjee S and Kundu TK, Nucleic Acids Res (2003) 31: 3236-47
【非特許文献４】American Thoracic Society and European Respiratory Society, Am J Respir Crit Care Med (2000)161: 646-64
【非特許文献５】Park JS et al., J Biol Chem (2004) 279: 7370-7
【非特許文献６】Wang H et al., Science (1999) 285(9): 248-51
【非特許文献７】Abraham EJ et al., J Immunol (2000) 165: 2950-4

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【００１４】

特発性肺線維症(IPF)については、現在のところ、抗炎症剤または抗線維化剤が処置されることが多いが、そのどちらもIPF患者の生存率、及び疾病の進行を改善するものではなく、肺移植以外に特に有効な治療方法がないのが実情である。IPF患者の生存期間中央値(生存率曲線において累積生存率が50％となる時間)は、呼吸器系症状の発生から3～4年と短い(非特許文献4)。このようにIPFの予後は悪いが、その病因は依然として不明であり、効果的な治療法の開発が待たれる。そこで、本発明は、IPF等の間質性肺炎を含む間質性肺疾患を治療または予防するのに有効な手段を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【００１５】

本発明者らは、まず、どのような疾患で、生体のどのような所にHMGB-1が逸脱或いは分

泌しているか確認するためにサンドイッチ酵素免疫測定法(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay; ELISA)法を開発した(Yamada et al. (2003) Clin Chem 9: 1535-7)。この方法により、いろいろな疾患のヒト検体についてHMGB-1発現を測定し、さらには、HMGB-1に対する抗体を作製した（特開2003-96099号公報）。

【００１６】

本発明では、肺線維症の病因におけるHMGB-1の役割について調べた。間質性肺疾患及びコントロールの間で、血清HMGB-1レベルに有意な差は見られなかったが、IPF及び過敏性肺炎(hypersensitivity pneumonitis; HP)の気管支肺胞洗浄液(blonchoalvelar lavage fluid; BALF)では、HMGB-1レベルは有意に上昇していた。しかしながら、全てのIPF患者において病状は安定しており、急激な疾病の悪化を示す事例は無かったため、BALF中のHMGB-1レベルが非常に高いIPF患者は見受けられなかった。NSIP患者については、統計的に有意ではなかったものの、コントロールと比較して、BALF中のHMGB-1レベルが高い事例が幾つかあった。

【００１７】

HMGB-1は当初、IPF及びNSIPの患部中の浸潤炎症細胞、肺胞マクロファージ、及び上皮細胞の核中において発見され、やや弱い細胞質の染色がこれらの細胞の幾つかで見られた。これらの結果は、HMGB-1発現がこれらの細胞においてアップレギュレーションされており、その一部のHMGB-1が細胞質中に見られることを示唆するものである。第一に、HMGB-1の経気管支投与がIL-1β、TNFα及びマクロファージ炎症タンパク質2(MIP2)等の前炎症性サイトカインの肺組織における増加を誘導することから考えて、HMGB-1は、間質性肺疾患における前炎症性サイトカインとして機能している可能性がある(非特許文献7)。第二に、核中のHMGB-1は、間質性肺疾患における転写因子として機能している可能性もある。本発明者らは、以前、DNA損傷及びアポトーシスが、IPFの肥厚上皮細胞中におけるp53及びp21タンパク質のアップレギュレーションと相関しているものの、正常な肺実質中にはDNA損傷、p21、p53のアップレギュレーションは認められないことを示した(Kuwano K et al., Am J Respir Crit Care Med (1996) 154(2 Pt 1): 477-83)。また、バーナジーらは、p53媒介転写活性化及びp53依存性アポトーシスの増幅にHMGB-1が必須であることを示している(非特許文献3)。従って、HMGB-1は、IPFの病因として、p53を媒介した機構を通して重要な役割を果たしている可能性があると本発明者らは考えた。

【００１８】

本発明者らは、マウスの正常な気管上皮細胞の幾つかの核で、HMGB-1が検出されることを見出した。ブレオマイシン点滴後には、細気管支上皮細胞の核及び細胞質の両方でHMGB-1発現は上昇していた。肺胞上皮細胞及びマクロファージにおけるHMGB-1発現は、5日後に徐々に増加した。ブレオマイシン点滴から14日目には、HMGB-1発現は主として線維化領域中の浸潤性炎症細胞及び上皮細胞の核及び細胞質中で検出された。上皮細胞及びマクロファージの細胞質中のHMGB-1が、線維化の進展に寄与している可能性がある。肺疾患以外の疾患についても同様の結果が見られた。なお、HMGB-1についての強い陽性シグナルが、ラット関節炎モデル及び慢性リウマチ性関節炎患者の炎症性滑膜細胞の単核細胞及び軟骨細胞の、核及び細胞質中で検出されたことが報告されている(Taniguchi N et al., Arthritis Rheum (2003) 48: 971-81; Kokkola R et al., Arthritis Rheum (2003) 48: 2052-8)。

【００１９】

肺線維症におけるHMGB-1の役割を突き止めるため、本発明者らはモデル動物において、中和抗体を用いたHMGB-1シグナル伝達の阻止を試みた。Kimらは、抗HMGB-1抗体が、NF-κB活性化、前炎症性サイトカイン産生、及び出血後の急性肺損傷における肺透過性を阻止すると報告している(Kim JY et al., Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol (2005) 288: L958-65)。本発明者らは、ブレオマイシン点滴から5日目に抗HMGB-1抗体を添加した。抗HMGB-1抗体は、14日目における体重減少、組織学的評価（病理学的段階）、TdTを介したdUTPニック末端標識法(TdT-mediated dUTP Nick End Labeling; TUNEL)陽性細胞数、肺コラーゲン濃度、並びに、BALF中の総細胞数及び好中球数を有意に抑制した。これらの結果

は、HMGB-1が、マウスのブレオマイシン誘導肺線維症の病因として関与することを示唆している。

【００２０】

さらに、エチルピルビン酸を用いてマクロファージからのHMGB-1放出の抑制を試みた。Ulloaらは、エチルピルビン酸が、p38マイトジェン活性化タンパクキナーゼ(Mitogen -Activated Protein Kinase; MAPK)及びNF-κBの両方シグナル伝達経路に干渉することによりTNFα及びHMGB-1のマクロファージからの放出を阻害することを突き止めた。彼らはさらに、エチルピルビン酸処置が、致命的な敗血症から救うものであることを示した(Ulloa L et al., Proc Natl Acad Sci USA (2002) 99: 12351-6)。本発明者らは、本明細書中に記載されるモデルにおける症状の進展に対するエチルピルビン酸の効果を確認するため、ブレオマイシン点滴より3日目から13日目にエチルピルビン酸を添加した。エチルピルビン酸処理は、14日目における、BALF中のHMGB-1レベル、総細胞数、リンパ球数、及び好中球数を有意に減少させた。最終的に、エチルピルビン酸処理は、本モデル動物における体重減少及び組織学的評価（病理学的段階）を有意に抑制した。この抑制効果が、マクロファージからのHMGB-1放出の阻害によるのか、またはp38MAPK及びNF-κBシグナル伝達経路の直接的な阻害によるのかは不明であるが、これらの結果は、エチルピルビン酸が、致命的な敗血症のin vivoモデルの効果的な阻害剤であるだけでなく、肺損傷及び線維症の効果的な阻害剤でもあることを示唆するものである。

【００２１】

抗HMGB-1抗体治療は、肺損傷及び線維症の進展を阻止する可能性があると本発明者らは考えた。第一に、Palumboらは、細胞外HMGB-1及びその受容体RAGEが、血管関連幹細胞の遊走及び増殖の両方を誘導し、そのため筋肉組織再生に役割を果たすかもしれないことを示している(Palumbo R et al., J Cell Biol (2004) 164: 441-9)。平滑筋細胞の増殖は、肺線維症における特徴の一つである。第二に、HMGB-1は、マクロファージの血管新生因子(例えば、血管内皮細胞増殖因子(Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF)、TNFα、インターロイキン8(IL-8)等)産生を活性化することが知られている(Ono M et al., Chemother Pharmacol (1999) 43: S69-71; Andersson U et al., J Leukoc Biol (2002) 72: 1084-91)。Schlueterらは、外因性HMGB-1が用量依存的に、in vitroにおいて上皮細胞の遊走及び萌芽を誘導することを示した(Schlueter C et al., Am J Pathol (2005) 166: 1259-63)。血管新生は、マウスのブレオマイシン誘導肺線維症における病理に関連しているとも報告されている(Hamada N et al., J Immunol (2005) 175: 1224-31; Burdick MD et al., Am J Respir Crit Care Med (2005) 171: 261-8)。第三に、Dumitriuらは、樹状細胞が活性化により活発に自身のHMGB-1を放出し、自身の成熟を誘導することを報告している。樹状細胞の成熟は、T細胞の生存及び増殖に必須である(Dumitriu LE et al., J Immunol (2005) 174: 7506-15)。肺損傷及び線維化の進展におけるT細胞の係わりについては議論の余地はあるが、抗HMGB-1治療は、T細胞活性化を阻害することにより、ブレオマイシンによる肺線維症の進展を減弱している可能性があると本発明者らは考えた。

【００２２】

結果として、本発明者らは、コントロールと比べてIPF及びHPにおけるBALF中のHMGB-1レベルが有意に増加していることを示した。HMGB-1は、IPF患者の肺組織中、肺胞マクロファージ、浸潤性炎症細胞及び上皮細胞で主に発現されている。抗HMGB-1抗体、またはエチルピルビン酸は、炎症、アポトーシス及び線維化を抑制することにより、ブレオマイシン誘導性肺障害からマウスを守る。肺線維症におけるHMGB-1の詳細な役割については確認の必要があるものの、HMGB-1機能の阻害が肺線維症の予防及び治療に効果的であることが本発明により示された。

【００２３】

そこで、本発明は、具体的には以下の発明に関するものである。

（１）抗ハイモビリティーグループボックスプロテイン1(HMGB-1)抗体を含む間質性肺疾患を治療または予防するための治療剤。

（２）間質性肺疾患が間質性肺炎である、上記(1)に記載の治療剤。

（３）間質性肺炎に起因する体重減少を阻害するものである、上記(2)に記載の治療剤。
（４）間質性肺炎に起因する線維化を阻害するものである、上記(2)に記載の治療剤。
（５）抗HMGB-1抗体が、HMGB-2よりもHMGB-1に強く結合することを特徴とする、上記(1)から(4)いずれかに記載の治療剤。
（６）抗HMGB-1抗体が、HMGB-2に結合しないことを特徴とする、上記(1)から(4)いずれかに記載の治療剤。
（７）抗HMGB-1抗体が、配列番号:1のアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識することを特徴とする、上記(1)から(6)いずれかに記載の治療剤。
【図面の簡単な説明】
【００２４】
【図１】ブタ胸腺よりHMGB-1及びHMGB-2をサンダースらの方法に従って調製する際に行った陽イオン交換クロマトグラフィーにおいて、溶出された画分を280nmの吸光度でモニタリングした結果を示す図である。溶出された画分について15％SDS-PAGEを行い、図中A及びBの画分がHMGB-1を含み、C及びDの画分がHMGB-2を含むことを確認した。
【図２】ヒトHMGB-1の167番目のアミノ酸残基(リシン)より180番目のアミノ酸残基(リシン)までの配列に対する、抗ブタHMGB-1ポリクローナル抗体の反応性をELISAにて測定した結果を示す図である。固相化抗原には、該配列のN末端にシステインを付加し、担体としてスカシガイのヘモシアニン（KLH）又はウシ血清アルブミン(BSA)を結合させた抗原を用いた。横軸は、該ELISA系に添加した抗ブタHMGB-1ポリクローナル抗体の濃度を示す。また縦軸は、該ELISA系において、該抗原に結合した抗ブタHMGB-1ポリクローナル抗体量を、パーオキシダーゼ(POD)標識抗ニワトリIgY抗体及びパーオキシダーゼ反応液を用い、吸光度として検出した値を示す。いずれの担体が付いたペプチド抗原に対しても、抗ブタHMGB-1ポリクローナル抗体は、濃度依存的に反応した。方法の詳細は実施例8に記載される。
【図３】ヒトHMGB-1の167番目のアミノ酸残基(リシン)より180番目のアミノ酸残基(リシン)までの配列のN末端にシステインを付加し、担体としてスカシガイのヘモシアニン(KLH)又はウシ血清アルブミン(BSA)を結合させた抗原を用い取得したモノクローナル抗体のヒトHMGB-1及びヒトHMGB-2に対する反応性をウエスタンブロッティングにて検討した結果を示す写真である。「1」は該ポリクローナル抗体（実施例9で調製したポリクローナル抗体）における結果である。「2」はパーオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体（ダコ社製）のみを反応させたもの。「3」は実施例6で得られた抗ブタHMGB-1ポリクローナル抗体を反応させ、ヒトHMGB-1,2の位置を明らかにしたものである。
【図４】クローンR06G10E7が産生するモノクローナル抗体の、ヒトHMGB-1及びHMGB-2に対する反応性を、ウエスタンブロット法により検討した結果を示す写真である。「1」はパーオキシダーゼ標識抗マウスＩｇＧ抗体（ダコ社製）のみを反応させたもの、「2」はR06G7E10（実施例11で調製したモノクローナル抗体）における結果である。「3」は実施例6で得られた抗ブタHMGB-1ポリクローナル抗体を反応させ、ヒトHMGB-1,2の位置を明らかにしたものである。
【図５】間質性肺疾患患者及び正常ボランティアの血清中のHMGB-1レベルを示す図である。図中の線は、各群における平均HMGB-1レベルを示す。
【図６】間質性肺疾患患者及び正常ボランティアのBALF中のHMGB-1レベルを示す図である。図中の線は、各群における平均HMGB-1レベルを示す。
【図７】HMGB-1についての免疫組織化学分析の代表的な結果を示す写真である。(a)正常肺実質；(b)NSIP患者の肺組織；(c)IPF患者の肺組織(低倍率)；(d) IPF患者の肺組織(高倍率)。パネルb中の矢印は、肺胞壁細胞中の染色された核を示す。パネルdにおける矢印は、上皮細胞中の染色された核を示す。元の倍率：a、×100；b及びd、×200；c、×40。
【図８】HMGB-1についての免疫組織化学分析の代表的な結果を示す写真である。(a)未処理マウスの肺組織；ブレオマイシン点滴後(b)1日目のマウス；(c)5日目のマウス、(d)7日目のマウス、(e)14日目のマウス、及び(f)14日目のマウス(高倍率)。パネルf中の矢印は、マクロファージの細胞質中の染色を示す。元の倍率：a-e、×100；ｆ、×400。

【図９】抗HMGB-1抗体投与の効果を表す、病理学的所見及びTUNEL染色の代表的な結果を示す写真である。ブレオマイシン点滴及びコントロール抗体投与から14日目の組織学的所見(a)、及びTUNEL染色の結果(b)。パネルb中の矢印は、TUNEL陽性細胞を指す。抗HMGB-1抗体投与した場合の、14日目の組織学的所見(c)、及びTUNEL染色の結果(d)。元の倍率：a及びc、×40；b及びd、×200。
【図１０】ブレオマイシン誘導肺線維症マウスに対する抗HMGB-1抗体の効果を示す図である。(a)ブレオマイシン点滴から14日目の、コントロール抗体または抗HMGB-1抗体で処理したマウスの体重を、各々、白棒または黒棒で示す。データは、平均±SEで示す。(b) ブレオマイシン点滴から14日目の、コントロール抗体または抗HMGB-1抗体で処理したマウスの病理段階を、各々、白丸または黒丸で示す。各丸は、各マウスについての結果に対応する。(c) ブレオマイシン点滴から14日目の、コントロール抗体または抗HMGB-1抗体で処理したマウスの肺組織中のTUNEL陽性細胞数を、各々、白棒または黒棒で示す。(d) ブレオマイシン点滴から14日目の、コントロール抗体または抗HMGB-1抗体で処理したマウスの肺ホモジェネート中のコラーゲン濃度を、各々、白棒または黒棒で示す。灰色の棒は、未処理マウスについてのコラーゲン濃度を示す。
【図１１】BAL細胞分析の結果に対する、抗HMGB-1抗体の効果を示す図である。ブレオマイシン点滴から14日目の、コントロール抗体または抗HMGB-1抗体で処理したマウスのBAL細胞数を、各々、白棒または黒棒で示す。灰色の棒は、未処理マウスについての結果を示す。データは、平均±SEで示す。
【図１２】ブレオマイシン誘導肺線維症マウスに対するEPの効果を示す図である。(a)及び(b)は、ブレオマイシン点滴から14日目の、EPまたはリンガー溶液で処理したマウスの血清中若しくはBALF中のHMGB-1レベルを、各々、白棒または黒棒で示す。Cとして示されるように、未処理マウスの血清またはBALFでは、HMGB-1レベルを検出することが出来なかった。(c)は、ブレオマイシン点滴から14日目の、EPまたはリンガー溶液で処理したマウスの体重を、各々、白棒または黒棒で示す。データは、平均±SEで示す。(d)は、ブレオマイシン点滴から14日目の、EPまたはリンガー溶液で処理したマウスの病理段階を、各々、白丸または黒丸で示す。各丸は、各マウスについての結果に対応する。
【図１３】BAL細胞分析の結果におけるEPの効果を示す図である。ブレオマイシン点滴から14日目の、EPまたはリンガー溶液で処理したマウスのBAL細胞数を、各々、白棒または黒棒で示す。灰色の棒は、未処理マウスについての結果を示す。データは、平均±SEで示す。
【図１４】線維芽細胞における抗HMGB-1抗体の(a)アポトーシス誘導、(b)細胞増殖、(c)コラーゲン産生に対する影響を示す図である。線維芽細胞は、HMGB-1存在下あるいは非存在下にて24時間培養した。データは、平均　標準誤差で示した。統計学的有意差は以下のように示した：*p<0.01，+p<0.05。
【発明を実施するための最良の形態】
【００２５】
本発明により、抗HMGB-1抗体を含む間質性肺疾患治療剤が提供される。HMGB-1に対する抗体の投与により、線維症モデルマウスにおいて、体重減少を阻害し、さらには肺胞壁の肥厚、肺胞空間の崩壊、線維芽細胞の増殖、アポトーシスの指標となるTUNEL染色陽性細胞の増加、肺ホモジェネート中のコラーゲン濃度増加、BALF中の総細胞数及び好中球の増加等、肺線維化の指標となる多くの症状を緩和できることが本願発明により見出された。
【００２６】
本発明で使用される抗HMGB-1抗体はHMGB-1に結合し、かつ間質性肺疾患に治療効果を有するものであれば特に限定されず、その由来（ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ニワトリ、等）、種類(ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体)、形状（改変抗体、修飾抗体、抗体断片、低分子化抗体、等）、アイソタイプ（IgG、IgMなど）等を問わない。
【００２７】
本発明で使用される抗体の好ましい態様の一つとして、HMGB-2よりもHMGB-1に強く結合する抗体を挙げることができる。特に好ましい抗体として、ヒトHMGB-2よりもヒトHMGB-1

に強く結合する抗体を挙げることができる。本発明において、HMGB-2よりもHMGB-1に強く結合するとは、抗体のHMGB-1に対する結合活性がHMGB-2に対する結合活性より大きいことを意味する。HMGB-1に対する結合活性がHMGB-2に対する結合活性より大きい限り結合活性の差は特に限定されないが、好ましくはHMGB-1に対する結合活性がHMGB-2に対する結合活性より2倍以上大きく、より好ましくはHMGB-1に対する結合活性がHMGB-2に対する結合活性より5倍以上大きく、さらに好ましくはHMGB-1に対する結合活性がHMGB-2に対する結合活性より10倍以上大きい。

【００２８】

抗体のHMGB-1又はHMGB-2への結合は当業者に公知の方法、例えばELISA、BIACORE、ウェスタンブロット、フローサイトメトリー等により検出することが可能である。又、抗体の結合活性はELISA、BIACORE等の当業者に公知の方法により測定することが可能である。

【００２９】

また、本発明で使用される抗体の好ましい態様の一つとして、HMGB-1に結合するがHMGB-2には結合しない抗体を挙げることができる。特に好ましい抗体として、ヒトHMGB-1に結合するがヒトHMGB-2には結合しない抗体を挙げることができる。本発明においてHMGB-2に結合しないとは、抗HMGB-1抗体とHMGB-2との結合が実質的に検出されないことを意味する。抗HMGB-1抗体がHMGB-2に結合するか否かは、ウェスタンブロット、ELISA等の通常の方法により確認することが可能である。

【００３０】

さらに、本発明で使用される抗体の好ましい態様の一つとして、HMGB-1に対する中和活性を有する抗体を挙げることができる。HMGB-1に対する中和活性を有する抗体はHMGB-1とその受容体との結合を阻害することが可能である。抗体の中和活性は当業者に公知の方法で確認することが可能であり、例えば、ELISA、BIACORE等で確認することが可能である。

【００３１】

本発明で使用される抗HMGB-1抗体は、公知の手段を用いてポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体として得ることができる。例えば、動物に対して抗原を免疫することにより調製することができる。

【００３２】

免疫原とするHMGB-1は特に限定されず、HMGB-1を構成する蛋白質全体、もしくは該蛋白質の部分ペプチド等を用いることができる。また、HMGB-1蛋白質またはその部分ペプチドを他の分子に結合させてもよいし、HMGB-1の部分配列（ペプチド）を適当な担体に結合させて免疫原としてもよい。また、必要に応じ、該抗原を細胞表面上に発現する細胞を免疫原とすることもできる。このような細胞は、天然（腫瘍セルライン等）由来の細胞、又は、組換え技術により抗原分子を発現するように構成された細胞であってもよい。

【００３３】

動物を免疫する抗原としては、免疫原性を有する完全抗原と、免疫原性を有さない不完全抗原（ハプテンを含む）が挙げられ、本発明で使用される抗体の取得にあたっては、そのどちらを用いてもよい。

【００３４】

HMGB-1蛋白質またはその部分ペプチドは公知の方法により取得することが可能であり、例えば、HMGB-1のヒト胸腺、ブタ胸腺、ウシ胸腺、ヒト胎盤、好中球、HL-60細胞株等からの取得方法が公知である（Goodwin H et al., Biochem Biophy Acta (1975) 405: 280-91; Yoshida M et al., J Biochem (1980) 95: 117-24; Adachi Y et al., J Chromatogr (1992) 530: 39-46）。また、ウシHMGB-1及びウシHMGB-2の混合物が、和光純薬工業社より販売されているので、これよりウシHMGB-1のみを精製し取得することもできる。

また、ヒト、ウシ、ブタ、ウサギ、マウス、ラット等のHMGB-1をコードする遺伝子が公知であり、それらの遺伝子情報に基づき、遺伝子工学的な手法により抗原となるHMGB-1を取得することもできる。例えば、ヒトHMGB-1のアミノ酸配列は、GenBank Accession No. NP_002119、それをコードするヌクレオチド配列は、GenBank Accession No. NM_002128として公開されている。このようにして取得された種々の動物由来のHMGB-1を本発明で使用

される抗体を得るための抗原（免疫原）として使用することができる。

【００３５】

本発明で使用される抗体を作製するために用いられる免疫原の好ましい例として、HMGB-1とHMGB-2との間で相同性の低いHMGB-1由来のアミノ酸配列を含むペプチドを挙げることができる。又、免疫原となるペプチドは、親水性が高いアミノ酸配列を含むことが好ましい。何故なら、親水性が高い程、そのアミノ酸配列がHMGB-1分子の表面に存在する可能性が高いため、これを免疫原として産生された抗体がHMGB-1に結合できる可能性も高いからである。本発明における免疫原を構成する各アミノ酸残基の親水性の高さの推定は、ホップらの方法（T.P.Hopp et al., Proc Natl Acad Sci USA (1981) 78: 3824-8）又はパーカーらの方法（Parker et al., Biochemistry (1986) 25: 5425-32）等により行うことができる。

【００３６】

従って、本発明で使用される抗体を作製するために用いられる免疫原の特に好ましい例として、HMGB-1とHMGB-2との間で相同性が低く、かつ親水性が高いHMGB-1由来のアミノ酸配列を含むペプチドを挙げることができる。HMGB-1とHMGB-2との間で相同性が低く、かつ親水性が高いHMGB-1由来のアミノ酸配列を含むペプチドは、例えば、実施例1の方法などにより決定することが可能である。

【００３７】

HMGB-1とHMGB-2との間で相同性が低く、かつ親水性が高いHMGB-1由来のアミノ酸配列を含むペプチドの具体例としては、ヒトHMGB-1の167番目のアミノ酸残基（リシン）より180番目のアミノ酸残基（リシン）までの、「Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys」（配列番号:1）を挙げることができる。

【００３８】

感作抗原による動物の免疫は、公知の方法に従って行われる。一般的な方法として、感作抗原を動物の腹腔内又は皮下に注射することが挙げられる。具体的には、感作抗原をPBS、生理食塩水等の適当量に希釈、懸濁したものに、所望により通常のアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントを適量混合、乳化した後、動物に4～21日毎に数回投与する。また、感作抗原免疫時に、適当な担体を使用してもよい。このように動物を免疫し、血清中に所望の上昇した抗体レベルが確認された後、モノクローナル抗体の取得を目的とする場合、ハイブリドーマを作製するために該動物から免疫細胞を採取し、細胞融合に付す。免疫する動物として、例えば、マウス、ラット、ハムスター、ニワトリ、又はアカゲザル等を用いることができる。

【００３９】

HMGB-1に結合するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体は、例えば、以下に記載の方法により取得することができる。

<u>ポリクローナル抗体・抗血清</u>

HMGB-1に対するポリクローナル抗体又は抗血清の取得は、以下の操作により取得することができる。

まず、前記の免疫原、又は前記の免疫原と担体の結合物を哺乳動物(マウス、ウサギ、ラット、ヒツジ、ヤギ、ウマ等)又は鳥類等に免疫する。HMGB-1の場合、1)動物を免疫すること自体が、免疫動物において強い炎症を引き起こし、血液中にHMGB-1を誘導すること、及び、2)HMGB-1の種間のホモロジーが非常に高く、誘導された抗HMGB-1抗体が炎症で誘導されてきたHMGB-1に吸収されてしまい、最終的に得られる抗血清中の目的とするHMGB-1との親和性が高い抗体が減り、親和性の弱い抗体ばかりが残ってしまうこと、等を考慮するとニワトリ等の鳥類を免疫動物として用いることが好ましい。ニワトリHMBG-1は、ヒトHMGB-1とのホモロジーが低いため(アミノ酸配列において76%の相同性)、ヒトHMGB-1に対する抗体の取得を目的とする場合、上記現象を回避することができる。

【００４０】

この前記の免疫原、又は前記の免疫原と担体の結合物の免疫量は、免疫動物の種類、免疫注射部位等により決められるものであるが、マウスの場合には約5～10週齢のマウス一

匹当り一回につき0.1μg～数mg、好ましくは5μg～１mgの前記免疫原、又は前記免疫原と担体の結合物を注射する。また、ウサギの場合はウサギ一匹当り一回につき10μg～数十mg、ニワトリの場合はニワトリ一羽当り一回につき0.1μg～数十mgの前記免疫原又は前記免疫原と担体の結合物を注射する。なお、この前記の免疫原、又は前記の免疫原と担体の結合物は、アジュバントと添加混合して注射することが好ましい。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、水酸化アルミニウムアジュバント又は百日咳菌アジュバント等の公知のものを用いることができる。注射は、皮下（腹部皮下、背部皮下、フットパット等）、静脈内、腹腔内等に行えばよい。

【００４１】

初回免疫後、2～3週間間隔で皮下（腹部皮下、背部皮下、フットパット等）、静脈内、腹腔内等に、前記の免疫原、又は前記の免疫原と担体の結合物を追加注射する。この場合も、前記の免疫原、又は前記の免疫原と担体の結合物は、アジュバントを添加混合して追加注射することが好ましい。初回免疫の後、免疫動物の血清中の抗体価の測定をELISA法等により繰り返し行い、一般には抗体価がプラトーに達したら全採血を行い、血清を分離して本発明で使用される抗体を含む抗血清を得る。

【００４２】

この抗血清から、硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウム等による塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過法又はアフィニティークロマトグラフィー等の方法、あるいはこれらの方法を組み合わせて抗体の精製を行い、ポリクローナル抗体を得る。

【００４３】

ここで得られたポリクローナル抗体は、HMGB-1には結合するがHMGB-2には結合しないポリクローナル抗体と、HMGB-1及びHMGB-2のいずれにも結合するポリクローナル抗体の両方よりなるものである。これらを、HMGB-2をリガンドとして固相に固定化したアフィニティークロマトグラフィーのカラムに通すことにより、HMGB-1には結合するがHMGB-2には結合しないポリクローナル抗体とHMGB-1及びHMGB-2のいずれにも結合するポリクローナル抗体に分離することができる。HMGB-1及びHMGB-2のいずれにも結合するポリクローナル抗体は、このカラムのリガンド（HMGB-2）を介して固相に結合し、捕集される。一方、HMGB-1には結合するが、HMGB-2には結合しないポリクローナル抗体は、このカラムのリガンド（HMGB-2）に結合することなく、このカラムを素通りするので、素通りした画分を得ることにより、ヒトHMGB-1には結合するが、ヒトHMGB-2には結合しないポリクローナル抗体を取得することができる。

【００４４】

また免疫原と担体の結合物を用いて動物に免疫した場合には、得られた抗血清又はポリクローナル抗体中にこの担体に対する抗体が存在するので、このような担体に対する抗体の除去処理を行うことが好ましい。この除去処理方法としては、担体を、得られたポリクローナル抗体又は抗血清の溶液中に添加して生成した凝集物を取り除くか、担体を不溶化固相に固定化してアフィニティークロマトグラフィーにより除去する方法等を用いることができる。

【００４５】

モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、ケーラーらの細胞融合法（Koehler G et al., Nature (1975) 256: 495-7）によるハイブリドーマ、又はエプスタンーバーウイルス等のウイルスによる腫瘍化細胞等の抗体産生細胞により得ることができる。

例えば、細胞融合法によるモノクローナル抗体の調製は、以下の操作により行うことができる。

まず、前記の免疫原、又は前記の免疫原と担体の結合物を、哺乳動物（マウス、ヌードマウス、ラットなど、例えば近交系マウスのBALB/c）又は鳥類（ニワトリなど）等に免疫する。この前記の免疫原、又は前記の免疫原と担体の結合物の免疫量は、免疫動物の種類、免疫注射部位等により適宜決められるものであるが、例えば、マウスの場合には一匹当り一回につき0.1μg～5mg、ニワトリの場合は一羽当り一回につき0.1μg～数十mgの前記

の免疫原又は前記の免疫原と担体の結合物を注射するのが好ましい。なお、前記の免疫原、又は前記の免疫原と担体の結合物は、アジュバントを添加混合して注射することが好ましい。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、水酸化アルミニウムアジュバント又は百日咳菌アジュバント等の公知なものを用いることができる。注射は、皮下（腹部皮下、背部皮下、フットパット等）、静脈内、腹腔内等に行えばよい。

【００４６】

初回免疫後、1〜2週間間隔で皮下（腹部皮下、背部皮下、フットパット等）、静脈内、腹腔内等に、前記の免疫原、又は前記の免疫原と担体の結合物を追加注射する。この追加注射の回数としては2〜6回が一般的である。この場合も前記の免疫原、又は前記の免疫原と担体の結合物は、アジュバントを添加混合して追加注射することが好ましい。

【００４７】

初回免疫の後、免疫動物の血清中の抗体価の測定をELISA法等により繰り返し行い、一般には抗体価がプラトーに達したら、前記の免疫原、又は前記の免疫原と担体の結合物を、例えばPBSあるいは生理食塩水（0.9%塩化ナトリウム水溶液）に溶解したものを静脈内又は腹腔内に注射し、最終免疫とする。この最終免疫の3〜5日後に、免疫動物の脾細胞、リンパ節細胞又は末梢リンパ球等の抗体産生能を有する細胞を取得する。

【００４８】

この免疫動物より得られた抗体産生能を有する細胞と哺乳動物等（マウス、ヌードマウス、ラットなど）の骨髄腫細胞（ミエローマ細胞）とを細胞融合させる。前記免疫細胞とミエローマ細胞との融合は、基本的には公知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインらの方法（Kohler及びMilstein, Methods Enzymol (1981) 73: 3-46）等に準じて行うことができる。

より具体的には、例えば、細胞融合は、細胞融合促進剤を用いて実施され得る。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)、センダイウイルス(HVJ)等が使用され得、さらに所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加することもできる。免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、任意に設定することができる。例えば、一般には、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1〜10倍とするのが好ましい。これら細胞に用いる培養液としては、ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM培養液等が例示されるが、その他、この種の細胞培養に通常用いられる培養液を適宜使用することができる。さらに、ウシ胎児血清(FCS)等の血液補液を培養液に加えてもよい。免疫細胞を所定量のミエローマ細胞とよく混合し、予め37℃程度に加温したPEG溶液（例えば、平均分子量1000-6000程度）を通常30-60%（w/v）の濃度で添加し、混合することによって細胞融合を行い、目的とする融合細胞（ハイブリドーマ）を形成させる。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことにより、ハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去する。形成されたハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えばHAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む培養液）で培養することにより選択することができる。上記HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間（通常、数日から数週間）継続する。ついで、通常の限界希釈法あるいはメチルセルロース含有半流動培地を用いるコロニー法等を実施することにより、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニング及び単一クローニングを行う。

【００４９】

細胞融合に用いられる好ましい免疫細胞としては、特に脾臓細胞が挙げられる。一方、免疫細胞と融合する親細胞としては、通常、哺乳動物のミエローマ細胞が用いられる。種々のミエローマ細胞株が公知であり、いずれのものを用いることもできる。例えば、P3(P3×63Ag8.653)（J Immunol (1979) 123: 1548-50）、P3×63Ag8U.1(Curr Topics Microbiol Immunol (1978) 81: 1-7)、NS-1(Kohler及びMilstein, Eur J Immunol (1976) 6: 511-9)、MPC-11(Margulies et al., Cell (1976) 8: 405-15)、SP2/0（Shulman et al., Nature (1978) 276: 269-70）、FO（deSt.Groth et al., J Immunol Methods (1980) 35: 1-

21）、S194(Trowbridge, J Exp Med (1978) 148: 313-23)、R210(Galfre et al., Nature (1979) 277: 131-3)等が好適に使用され得る。

【００５０】

このようにして得られたハイブリドーマの培養上清を、前記の免疫原、前記の免疫原と担体の結合物、又はヒトHMGB-１等を用いてELISA法やウエスタンブロット法等の免疫学的測定法によりアッセイすることにより、ヒトHMGB-１等に結合する抗体を産生するハイブリドーマを選択することができる。また、前記のハイブリドーマの培養上清を、ヒトHMGB-2等を用いてELISA法やウエスタンブロット法等の免疫学的測定法によりアッセイすることにより、ヒトHMGB-2よりヒトHMGB-1により強く結合する抗体や、ヒトHMGB-1には結合するがヒトHMGB-2等には結合しない抗体を産生するハイブリドーマを選択することができる。この2種類のハイブリドーマ選択方法と、限界希釈法あるいはメチルセルロース含有半流動培地を用いるコロニー法等の公知のクローニングの方法を組み合わせて行うことにより、本発明で使用される特に好ましい抗体（モノクローナル抗体）、即ちヒトHMGB-1には結合するが、ヒトHMGB-2には結合しない抗体（モノクローナル抗体）の産生細胞株を単離して得ることができる。このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

【００５１】

ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法に従い培養し、その培養上清としてモノクローナル抗体を得る方法が挙げられる。または、ハイブリドーマと適合性がある動物の腹腔内に、ハイブリドーマを投与して増殖させ、該動物に生じる腹水よりモノクローナル抗体を得る方法を採用してもよい。この際、動物の腹腔内に、予めプリスタンを投与し、刺激しておくとよい。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、後者は、抗体を簡易に大量生産するのに適している。

【００５２】

モノクローナル抗体産生細胞株を培養して抗体を得る場合、無血清培地、低濃度血清培地、または抗体除去処理を施した血清を含む培地等を培地として用いることができる。抗体の精製がより容易となるDMEM、RPMI1640培地又はASF培地103等の培地を、好適には用いることができる。

【００５３】

また、上述のようにヒト以外の動物に抗原を免疫してハイブリドーマを得る代わりに、ヒトリンパ球をin vitroで抗原に感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞と融合させ、所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを得ることもできる（特公平1-59878号公報参照）。さらに、ヒト抗体遺伝子の全てまたは一部のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原を投与して抗体産生細胞を取得して、これを不死化させ、所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを取得してもよい（WO94/25585号; WO93/12227号; WO92/03918号; WO94/02602号等参照）。

【００５４】

抗体断片

本発明で使用される抗HMGB-1抗体は、HMGB-1に結合し、間質性肺疾患に対して治療効果を有するものである限り、抗体断片又は抗体修飾物であってもよい。抗体断片としては、Fv、Fab、Fab’、$F(ab')_2$、ダイアボディ(diabody；Db)、線状抗体、一本鎖抗体（以下、scFvとも記載する）分子等が含まれる。「Fv」断片は、最小の抗体断片であり、完全な抗原認識部位と結合部位を含む。「Fv」断片は、1つの重（H）鎖可変領域（V_H）及び軽（L）鎖可変領域（V_L）が、非共有結合により強く連結されたダイマー（V_H-V_Lダイマー）である。各可変領域の3つの相補性決定領域（complementarity determining region；CDR）が相互作用し、V_H-V_Lダイマーの表面に抗原結合部位が形成される。6つのCDRにより、抗体の抗原結合部位が形成されている。しかしながら、1つの可変領域（又は、抗原に特異的な3つのCDRのみを含むFvの半分）であっても、全結合部位よりも親和性は低くなるが、抗原を認識し、結合する能力を有する。従って、そのような1つの可変領域若しくはCDRの

みを含む断片、3つのCDRのみを含むFvの半分も、HMGB-1に結合し、間質性肺疾患に対して治療効果を有するものである限り、本発明において使用することができる。

【００５５】

また、Fab断片（F(ab)とも呼ばれる）はさらに、L鎖の定常領域及びH鎖の定常領域（CH1）を含む。Fab'断片（F(ab’)とも呼ばれる）は、抗体のヒンジ領域からの1又はそれ以上のシステインを含むH鎖CH1領域のカルボキシ末端由来の数残基を付加的に有する点でFab断片と異なっている。Fab'-SH断片（F(ab’)-SHとも呼ばれる）は、定常領域の1又はそれ以上のシステイン残基が遊離チオール基を有する形態のFab'断片を示すものである。F(ab')$_2$断片は、2分子のFab'-SH断片がジスルフィド結合した抗体断片である。これらの抗体断片を作製する方法としては、具体的には、完全分子の抗体を、酵素、例えばパパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させる方法や、抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後に、適当な宿主細胞で発現させる方法が挙げられる(例えば、Co MS et al., J Immunol （1994）152: 2968-76)。その他の抗体断片として、化学的結合を含有する抗体断片も当業者には知られており、これらの抗体も本発明において使用することが可能である。

【００５６】

ダイアボディは、遺伝子組換え手法により構築された二価(bivalent)の抗体断片を指す(Holliger P et al. (1993) Proc Natl Acad Sci USA 1993, 90: 6444-8; EP404,097号; WO93/11161号等)。ダイアボディは、2本のポリペプチド鎖から構成されるダイマーであり、ポリペプチド鎖は各々、同じ鎖中で、抗体由来のL鎖可変領域(V_L)及びH鎖可変領域(V_H)が、互いに結合できない位に短い、例えば、5残基程度のリンカーにより結合されている。同一ポリペプチド鎖上にコードされるV_LとV_Hとは、その間のリンカーが短いため単鎖可変領域フラグメントを形成することが出来ず二量体を形成するため、ダイアボディは2つの抗原結合部位を有することとなる。

【００５７】

一本鎖抗体又はscFv抗体断片には、抗体のV_H及びV_L領域が含まれ、これらの領域は、単一のポリペプチド鎖中に存在する。一般に、FvポリペプチドはさらにV_H及びV_L領域の間にポリペプチドリンカーを含んでおり、これによりscFvは、抗原結合のために必要な構造を形成することができる（Huston JS et al., Proc Natl Acad Sci USA (1988) 85: 5879-83；scFvの総説については、Pluckthun『The Pharmacology of Monoclonal Antibodies』Vol.113（Rosenburg and Moore ed (Springer Verlag, New York) pp.269-315, 1994）を参照）。本発明におけるリンカーは、その両端に連結された抗体可変領域の発現、及び活性を完全に阻害するものでなければ特に限定されない。

【００５８】

SCFVをコードするDNAは、例えば、以下のように得られる。

(1) 前記抗体のH鎖または、H鎖V領域をコードするDNA、およびL鎖または、L鎖V領域をコードするDNAを鋳型とし、それらの配列のうちの所望のアミノ酸配列をコードするDNA部分を、その両端を規定するプライマー対を用いてPCR法により増幅する。

(2) 次いで、さらにペプチドリンカー部分をコードするDNAおよびその両端を各々H鎖、L鎖と連結させるように規定するプライマー対を組み合わせて増幅する。

また一旦SCFVをコードするDNAが作製されれば、それらを含有する発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いて常法に従って、SCFVを得ることができる。

【００５９】

さらに必要に応じ、本発明で使用される抗体は、二種特異性抗体であってもよい。IgGタイプ二種特異性抗体はIgG抗体を産生するハイブリドーマ二種を融合することによって生じるhybrid hybridoma (quadroma)によって分泌させることが出来る（Milstein C et al. (1983) Nature 305: 537-40）。また、二種のIgGそれぞれを構成するL鎖及びH鎖の遺伝子、合計4種の遺伝子を細胞に導入することによって共発現させることによって分泌させることが出来る。この際H鎖のCH3領域に適当なアミノ酸置換を施すことによって、H鎖

についてヘテロな組合せのIgGを優先的に分泌させることも出来る（Ridgway JB et al. (1996) Protein Engineering 9: 617-21; Merchant AM et al. (1998) Nat Biotech 16: 677-81）。

【００６０】

Fab’を化学的に架橋することによっても二種特異性抗体を作製し得る。例えば、一方の抗体から調製したFab’をo-PDM(ortho-phenylenedi-maleimide)にてマレイミド化し、これともう一方の抗体から調製したFab’を反応させることにより、異なる抗体由来Fab’同士を架橋させ二種特異性 $F(ab')_2$を作製することが出来る（Keler T et al. (1997) Cancer Res 57: 4008-14）。また、Fab’-チオニトロ安息香酸(TNB)誘導体とFab’-チオール(SH)等の抗体断片を化学的に結合する方法も知られている（Brennan M et al. (1985) Science 229: 81-3）。

【００６１】

化学架橋の代りに、Fos、Jun等に由来するロイシンジッパーを用いることも出来る。Fos、 Junはホモダイマーも形成するが、ヘテロダイマーを優先的に形成することを利用する。Fosロイシンジッパーを付加したFab’とJunのそれを付加したもう一方のFab’を発現調製する。温和な条件で還元した単量体Fab’-Fos、 Fab’-Junを混合し反応させることによって二種特異性 $F(ab')_2$が形成できる（Kostelny SA et al. (1992) J Immunol 148: 1547-53）。この方法は、Fab’に限定されるものでなく、scFv、 Fv等を連結する際にも応用可能である。

【００６２】

ダイアボディも、二種特異性を有するように作製し得る。二種特異性ダイアボディは、二つのcross-over scFv断片のヘテロダイマーである。つまり、二種の抗体A,B由来のV_HとV_Lを5残基前後の比較的短いリンカーで結ぶことによって作製された$V_H(A)$-$V_L(B)$, $V_H(B)$-$V_L(A)$を、ヘテロダイマーとして構成することにより、作製することが出来る（Holliger P et al. (1993) Proc Natl Acad Sci USA 90: 6444-8）。

【００６３】

この際、二種のscFvを15残基程度の柔軟な比較的長いリンカーで結び(一本鎖ダイアボディ：Kipriyanov SM et al. (1999) J Mol Biol 293: 41-56)、適当なアミノ酸置換(knobs-into-holes: Zhu Z et al. (1997) Protein Sci 6: 781-8)を行うことによって目的の構成を促進させることも出来る。二種のscFvを15残基程度の柔軟な比較的長いリンカーで結ぶことによって作製できる$sc(Fv)_2$も二種特異性抗体となり得る（Mallender WD et al. (1994) J Biol Chem 269: 199-206）。

【００６４】

組換え抗体

抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込み作製された発現ベクターを宿主に導入する遺伝子組み換え技術により、本発明で使用される抗体を組換え型の抗体として作製することも可能である（例えば、Vandamme et al., Eur J Biochem (1990) 192: 767-75参照）。具体的には、最初に、所望の抗体を産生するハイブリドーマから、mRNAを調製する。公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法（Chirgwin et al., Biochemistry (1979) 18: 5294-9）、AGPC法（Chomczynski et al., Anal Biochem (1987)162: 156-9）等により、抗体を産生する脾臓細胞から全RNAを調製した後、mRNA Purification Kit (Pharmacia)等を使用して、mRNAを調製することができる。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia)を用いることにより、全RNAを調製することなしに、mRNAのみを直接調製することもできる。次に、得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業)等を用いて行うことができる。また、cDNAの合成及び増幅は、5’-Ampli FINDER RACE Kit (Clontech)を用い、PCRを利用した5’-RACE法（Frohman et al., Proc Natl Acad Sci USA (1988) 85: 8998-9002; Belyavsky et al., Nucleic Acids Res (1989) 17: 2919-32）等により行うことができる。例えば、可変領域付近に対応するプライマーを用いて、RT-PCRにてL鎖、H鎖可変領域（V_L、V_H）のcDNAを増幅し

、回収する。プライマーとしては、CDRに対応するプライマー、CDRよりも多様性の低いフレームワークに対応するプライマー、あるいはシグナル配列とCH1若しくはL鎖定常領域（C_L）に対応するプライマーを用いることができる。続いて、得られたPCR産物から目的とするDNA断片を精製し、ベクターDNAに連結することにより組換えベクターを作製する。該組換えベクターを大腸菌等の宿主細胞に導入し、形質転換された細胞のコロニーを選択する。得られた細胞を培養することにより、所望の組換え抗体を作製することができる。必要に応じ、目的とする抗体をコードする遺伝子の塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチド法等により確認する。

また、上記で得られた抗体V領域をコードするDNAを、所望の抗体定常領域（C領域)をコードするDNAを含有する発現ベクターへ組み込むこともできる。発現ベクターは、発現制御領域、例えば、エンハンサー及びプロモーターを含み、本発明の製剤において使用される抗体のDNAは、該領域の制御により発現されるように組み込まれる。この発現ベクターを用い、適当な宿主細胞を形質転換することにより、所望の分子型の抗体を発現させ、これを得ることができる。

【００６５】

抗体遺伝子の発現は、抗体重鎖（H鎖）又は軽鎖（L鎖）をコードするDNAを別々に発現ベクターに組み込んで宿主細胞を同時形質転換させてもよいし、或いは、H鎖及びL鎖をコードするDNAが組み込まれた単一の発現ベクターにより宿主細胞を形質転換してもよい（WO94/11523等参照）。

【００６６】

ヒト抗体及びヒト化抗体

本発明で使用される抗体は、ニワトリ抗体、マウス抗体、ラット抗体等、その由来は限定されないが、ヒトへの投与を目的とした場合、ヒト化抗体又はヒト抗体が好ましい。ヒト抗体の取得方法は既に知られており、例えば、ヒト抗体遺伝子の全てまたは一部のレパートリーを有するトランスジェニック動物を目的の抗原で免疫することで、目的のヒト抗体を取得することができる（WO93/12227，WO92/03918，WO94/02602，WO94/25585，WO96/34096，WO96/33735参照）。

【００６７】

本発明で使用される組換え型抗体には、ヒトにおける異種抗原性を低下させること等を目的に、遺伝子工学的手法を用いて作製した改変抗体を使用することができる。改変抗体にはヒト抗体定常領域を有するキメラ抗体、ヒト化抗体などが含まれる。このような遺伝子改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。具体的には、例えば、キメラ抗体は、免疫動物の抗体のH鎖、及びL鎖の可変領域と、ヒト抗体のH鎖及びL鎖の定常領域からなる抗体である。免疫動物由来の抗体の可変領域をコードするDNAを、ヒト抗体の定常領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることによって、キメラ抗体を得ることができる。

【００６８】

ヒト化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称される改変抗体である。ヒト化抗体は、免疫動物由来の抗体のCDRを、ヒト抗体のCDRへ移植することによって構築される。その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。具体的には、まず、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域（framework region；FR）とを連結するように、DNA配列を設計する。このDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように数個に分ける。それぞれのオリゴヌクレオチドを合成し、PCR法により、設計したDNA配列に組み立てる。組み立てられたDNAを、ヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させる（EP 239400; WO 96/02576参照）。

CDRを介して連結されるヒト抗体のFRとしては、結果として作製されるヒト化抗体のCDRが、良好な抗原結合部位を形成できるようなFRが選択される。必要に応じ、ヒト化抗体のCDRが適切な抗原結合部位を形成するように、ヒト化抗体の可変領域におけるFRのアミノ酸を置換してもよい（Sato K et al. (1993) Cancer Res 53: 851-6）。また、他の様々なヒト抗体由来のFRに置換してもよい（WO 99/51743参照）。

【００６９】
アミノ酸改変抗体
　本発明で使用される抗体は、上述のようにして得られた抗体のアミノ酸配列を置換、欠失、付加及び/または挿入等により改変されたものも含まれる。アミノ酸配列の改変は、公知の方法により行うことができる。アミノ酸の置換、欠失、付加及び/または挿入等により改変された抗体は改変前の抗体と同様の活性を有していることが好ましい。ここで、「同様の活性」とは、生物学的又は生化学的活性を意味する。生物学的又は生化学的活性の具体的な例としては、結合活性、中和活性等を挙げることができる。
【００７０】
　通常、改変前の抗体と同様の活性を有する抗体は、改変前の抗体と高い相同性を有する。本発明において高い相同性とは、アミノ酸レベルにおいて、通常、少なくとも50%以上の同一性、好ましくは75%以上の同一性、さらに好ましくは85%以上の同一性、さらに好ましくは95%以上の同一性を指す。ポリペプチドの相同性を決定するためには、例えば、文献（Wilbur及びLipman, Proc Natl Acad Sci USA (1983) 80: 726-30）等に記載のアルゴリズムを用いることができる。
【００７１】
　本発明で使用される抗体は、このようにアミノ酸の置換、欠失、付加及び/または挿入等により改変された抗体であってもよい。
【００７２】
抗体修飾物
　さらに、本発明で使用される抗体には、抗体修飾物が含まれる。抗体修飾物としては、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）等の各種分子と結合した抗体を挙げることができる。本発明の治療剤において使用される抗体修飾物においては、結合される物質は限定されない。抗体を安定化するため、その結合能を高めるため等、様々な目的で抗体の修飾を行うことができる。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。
【００７３】
抗体発現・産生
　構築された抗体遺伝子を公知の方法により発現させ、抗体を取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なプロモーター／エンハンサー、発現させる抗体遺伝子、及びその３’側下流にポリAシグナルを機能的に結合させたDNAを含む発現ベクターにて、抗体遺伝子を発現させることができる。例えば、プロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウイルス前期プロモーター／エンハンサーが挙げられる。また、それ以外にも、レトロウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、シミアンウイルス40（SV40）などのウイルスプロモーター／エンハンサーやヒトエロンゲーションファクター-1αなどの哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサーを用いることができる。例えば、SV40プロモーター／エンハンサーを使用する場合には、Mullingらの方法 (Mulling RC et al., Nature (1979) 277: 108-14)に従えば、容易に抗体遺伝子を発現することができる。ヒトエロンゲーションファクター-1αを用いる場合には、Mizushimaの方法 (Mizushima, Nucleic Acids Res (1990) 18: 5322) に従えば、容易に抗体遺伝子を発現することができる。大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列、発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させたDNAを含む発現ベクターにて、抗体遺伝子を発現させることができる。例えば、プロモーターとしてLacZプロモーター、araBプロモーターが挙げられる。
【００７４】
　LacZプロモーターを使用する場合、例えば、Wardらの方法 (Ward ES et al., Nature (1989) 341: 544-6)に従えばよい。araBプロモーターを用いる場合、例えば、Betterらの方法 (Bette M et al., Science (1988) 240: 1041-3)に従えばよい。抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、例えば、pelBシグナル

配列 (Lei SP et al., J Bacteriol (1987) 169: 4379-83)を使用すればよい。ペリプラズムに産生させた抗体を分離した後、抗体の構造を適切に組み直して使用することができる (WO 96/30394)。

【００７５】

複製起源としては、ウシパピローマウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、シミアンウイルス40（SV40）などから由来する複製起源を用いることができる。さらに、アミノグリコシドトランスフェラーゼ遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子、大腸菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子などを含むことができ、これらは、宿主細胞系において遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターにおいて選択マーカーとして使用される。

【００７６】

本発明で使用される抗体の製造のために、任意の産生系を使用することができる。抗体製造のための産生系は、in vitro及びin vivoの産生系がある。In vitroの産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。真核細胞を使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いる産生系がある。動物細胞としては、(a) 哺乳類細胞、例えばCHO、COS、 (b) 両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞、 (c) 昆虫細胞、例えばsf9、sf21が知られている。植物細胞としては、例えばニコティアナ属由来の細胞が知られている。これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、(a) 酵母、例えばサッカロミセス属、(b) 糸状菌、例えばアスペルギルス属が知られている。原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌、枯草菌が知られている。これらの細胞に、目的の抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞をin vitro で培養することによって抗体が得られる。培養は公知の方法に従う。例えば哺乳類細胞の場合、培養液としてはDMEM、MEM、RPMI1640などを使用することができる。その際牛胎児血清などの血清補液を併用することもできるし、無血清培養でもよい。また抗体遺伝子を導入した細胞を動物細胞の腹腔等へ移植して、in vivoにて抗体を産生してもよい。In vivoの産生系としては、動物を使用する産生系や植物を使用した産生系が挙げられる。動物を使用する場合、例えば、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる。

【００７７】

また、哺乳類動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。例えば、ヤギβカゼインのような乳汁中に固有に産生される蛋白質をコードする遺伝子の途中に抗体遺伝子を挿入して、融合遺伝子を調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギに注入する。胚を受容したヤギから産まれるトランスジェニックヤギまたはその子孫が産生する乳汁から目的の抗体を得る。トランスジェニックヤギにおいて目的の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適時ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい。また昆虫としては、カイコを用いることができる。カイコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を挿入したバキュロウイルスをカイコに感染させて、このカイコの体液より目的の抗体を得る。(Maeda S et al., Nature (1985) 315: 592-4)。 さらに、植物を抗体産生に使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを用いる場合、目的とする抗体をコードするポリヌクレオチドを植物発現用ベクター、例えばpMON530に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens)のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えばニコチアナ・タバカム (Nicotiana tabacum)に感染させ、タバコの葉より所望の抗体を得ることができる (Ma et al., Eur J Immunol (1994) 24:131-8)。

【００７８】

抗体精製

上述のように、ハイブリドーマ培養・増殖または遺伝子組換えにより得られた抗体は、均一になるまで精製することができる。抗体の分離、精製は、通常の蛋白質で使用されている分離、精製方法を使用すればよい。例えば、アフィニティークロマトグラフィー等の

クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、硫酸アンモニウムまたは硫酸ナトリウム等による塩析、透析、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組合せれば、抗体を分離、精製することができる（Antibodies : A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988）が、これらに限定されるものではない。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラム、プロテインLカラム等が挙げられる。

【００７９】

本発明ので使用される抗HMGB-1抗体の選択は、例えば、ELISA法等により、ヒトHMGB-1との反応性を調べることにより行うことができる。

【００８０】

間質性肺疾患の治療剤/予防剤

本発明は、抗HMGB-1抗体を有効成分として含有する間質性肺疾患治療剤を提供する。本発明における間質性肺疾患治療剤には、間質性疾患の予防のために用いられる予防剤も含まれる。本発明の治療剤は、特に、INFを含む間質性肺炎の治療に好適である。本発明の治療剤は、間質性肺炎に起因する体重減少を阻害し、さらには肺胞壁の肥厚、肺胞空間の崩壊、線維芽細胞の増殖、アポトーシスを起こす細胞の増加、肺ホモジェネート中のコラーゲン濃度増加、好中球等の増加等、肺線維化の各種症状を緩和する効果を有するものと期待される。

【００８１】

本発明の抗HMGB-1抗体を有効成分として含む治療剤は、必要に応じて、それらに対して不活性な適当な薬学的に許容される担体、媒体等と混和して製剤化することができる。例えば、滅菌水や生理食塩水、安定剤、賦形剤、酸化防止剤(アスコルビン酸等)、緩衝剤(リン酸、クエン酸、他の有機酸等)、防腐剤、界面活性剤(PEG、Tween等)、キレート剤(EDTA等)、結合剤等を挙げることができる。また、その他の低分子量のポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチンや免疫グロブリン等の蛋白質、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン及びリシン等のアミノ酸、多糖及び単糖等の糖類や炭水化物、マンニトールやソルビトール等の糖アルコールを含んでいてもよい。注射用の水溶液とする場合には、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えば、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール(エタノール等)、ポリアルコール(プロピレングリコール、PEG等)、非イオン性界面活性剤(ポリソルベート80、HCO-50)等と併用してもよい。

【００８２】

本発明における製剤は、抗HMGB-1抗体を、互いの機能が阻害されない限り、二種類以上含んでいても良い。さらに、必要に応じ、本発明における製剤は、その他の間質性肺疾患のための治療剤と組み合わせて使用してもよい。

【００８３】

また、必要に応じ本発明における製剤をマイクロカプセル（ヒドロキシメチルセルロース、ゼラチン、ポリ〔メチルメタクリル酸〕等のマイクロカプセル)に封入することができる。また、必要に応じ本発明のにおける製剤をコロイドドラッグデリバリーシステム（リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル等)とすることもできる（"Remington's Pharmaceutical Science 16th edition", Oslo Ed. (1980)等参照)。さらに、薬剤を徐放性の薬剤とする方法も公知であり、本発明の製剤に適用し得る(Langer et al. (1981) J Biomed Mater Res 15: 267-77 ; Langer (1982) Chemtech 12: 98-105; 米国特許第3,773,919号; EP58,481号; Sidman et al. (1983) Biopolymers 22: 547-56; EP133,988号)。

【００８４】

本発明の治療剤の投与量は、剤型の種類、投与方法、患者の年齢や体重、患者の症状、疾患の種類や進行の程度等を考慮して、最終的には医師の判断により適宜決定されるものである。一般に大人では、1日当たり含有抗体量として、0.1～10000 mgを1～数回に分けて、投与することができる。より好ましくは5～5000mg／日、最も好ましくは50～2000mg

／日である。これらの投与量は患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。投与期間も、患者の治癒経過等に応じて適宜決定することが好ましい。投与経路としては、特に限定するものではないが、静脈内投与、皮下投与などが行われる。

【００８５】

また、本発明におけるの製剤において使用される抗体をコードする遺伝子を遺伝子治療用ベクターに組込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。抗体をコードする遺伝子の投与方法としては、nakedプラスミドにより直接投与する方法、リポソーム等にパッケージングして投与する方法、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、アデノウイルス関連ベクター、HVJベクター等の各種ウイルスベクターとして形成し投与する方法（Adolph『ウィルスゲノム法』, CRC Press, Florid (1996)参照）、または、コロイド金粒子等のビーズ担体に被覆（WO93/17706等）して投与する方法が挙げられる。しかしながら、生体内において抗体が発現され、その作用を発揮できる限りいかなる方法で投与してもよい。好ましくは、適当な非経口経路 (静脈内、腹腔内、皮下、皮内、脂肪組織内、乳腺組織内、吸入または筋肉内の経路を介して注射、注入する方法、またはガス誘導性粒子衝撃法（電子銃等による）、点鼻薬等粘膜経路を介する方法等)により十分な量が投与される。ex vivoにおいて、リポソームトランスフェクション、粒子衝撃法（米国特許第4,945,050号）またはウイルス感染を利用して、血液細胞及び骨髄由来細胞等に抗体をコードする遺伝子を導入して、該細胞を患者に注入してもよい。

【００８６】

また本発明は、本発明の製剤を投与する工程を含む、間質性肺疾患を治療するための方法を提供する。抗体もしくはその製剤の投与は、例えば、前記の方法により実施することができる。また本発明は、抗HMGB-1抗体の、本発明の治療剤の製造のための使用に関する。さらに本発明は、少なくとも本発明の治療剤を含む、上記方法に用いるためのキットを提供する。該キットには、その他、注射筒、注射針、薬学的に許容される媒体、アルコール綿布、絆創膏、または使用方法を記載した指示書等をパッケージしておくこともできる。

なお、本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

【実施例】

【００８７】

以下、実施例により本発明をより具体的に詳述するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。以下、実施例により本発明をより具体的に詳述するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

【００８８】

〔実施例１〕ヒトHMGB-1のアミノ酸配列における、親水性が高く、ヒトHMGB-2との間で相同性の低いアミノ酸配列の選択

親水性が高く、ヒトHMGB-2との間で相同性の低いアミノ酸配列を、ヒトHMGB-1のアミノ酸配列より選択した。

（1）ヒトHMGB-1のアミノ酸配列(配列番号:6)は、前記のウエンらのデータの通りである(Wen et al., Nucleic Acids Res (1989) 17: 1197-214)。

（2）このヒトHMGB-1のアミノ酸配列の各アミノ酸残基の親水性の高さの推定を、前記のホップらの方法(T.P Hopp et al., Proc Natl Acad Sci USA (1981) 78: 3824-8)により行った。

（3）次に、このヒトHMGB-1のアミノ酸配列のうち親水性の高い配列を、ヒトHMGB-2のアミノ酸配列(M. Yoshida et al., J Biol Chem (1992) 267: 6641-5)と比較した。そして、この親水性の高いアミノ酸配列の中から、ヒトHMGB-1とヒトHMGB-2との間で相同性の低いヒトHMGB-1のアミノ酸配列を選択した。

（4）ここで本発明者らが選択したアミノ酸配列の第1番目は、ヒトHMGB-1の167番目のア

ミノ酸残基（リシン）より180番目のアミノ酸残基（リシン）までの、「Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys」（配列番号:1）である。なお、このヒトHMGB-1のアミノ酸配列「Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys」（配列番号:1）は、これに相当するヒトHMGB-2のアミノ酸配列「Lys Ser Glu Ala Gly Lys Lys Gly Pro Gly Arg Pro Thr Gly」（配列番号:2）とは9個のアミノ酸残基が異なっている。

【００８９】

〔実施例２〕ペプチドの合成

実施例1で選択したアミノ酸配列の各々のＮ末端に、担体に結合させるためにシステインを結合させたアミノ酸配列「Cys Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys」（配列番号:3）のペプチドをそれぞれ合成した。

まず、アプライドバイオシステムズ社(Applied Biosystems)のモデル430Aペプチド自動合成装置(Model 430A peptide synthesizer)により、取扱説明書に従って、t-ブトキシカルボニルアミノ酸固相法でアミノ酸配列「Cys Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys」（配列番号:3）のペプチドの合成を行った。副反応を抑制するためにスカベンジャーとして、ジメチルスルファイド、p-チオクレゾール、m-クレゾール及びアニソールの存在下でフッ化水素法により樹脂から合成したペプチドの脱離を行った。その後、ジメチルエーテルによりスカベンジャーを抽出し、そして2N酢酸により合成したペプチドの抽出を行った。陰イオン交換樹脂であるダウエックス1-X2(DOWEX 1-X2)により陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを行い精製をして、オクタデシル(ODS)カラムでの高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により、メインピークのパターンの確認を行った。そして、エバポレーターにより凍結乾燥をして濃縮を行った後、HPLCにより精製を行い分取した。なお、このHPLC精製時の装置及び条件は、山村化学研究所社の逆相ODSカラムYMC-D-ODS-5（20mm×300mm）を用い、日本分光工業社のTWINCLEポンプ及び日本分光工業社のGP-A40型グラジエンターで0.1％トリフルオロ酢酸(TFA)中アセトニトリルの0％から70％のグラジエントを流速7.0mL／分で行い、日本分光工業社製UVIDEC-100V型検出器(210nm，1.28AUFS)で検出を行った。

ここで精製分取した合成ペプチドを、エバポレーターで凍結乾燥して濃縮した。得られた合成ペプチドの純度をHPLCで分析した。装置及び条件は、山村化学研究所社の逆相ODSカラムYMC-R-ODS-5（4.9mm×300mm）を用い、日本分光工業社のTWINCLEポンプ及び日本分光工業社のGP-A40型グラジエンターで0.1％トリフルオロ酢酸(TFA)中アセトニトリルの0％から70％のグラジエントを流速1.0mL／分、25分間で行い、日本分光工業社製UVIDEC-100V型検出器(210nm，1.28AUFS)で検出を行った。これより得られた合成ペプチドの純度がほぼ100％であることが分かった。

【００９０】

〔実施例３〕免疫原の調製

担体であるスカシガイのヘモシアニン(KLH)(カルビオケム社製)又はウシ血清アルブミン(BSA)(生化学工業社製)の10mgを10mMリン酸二水素カリウム-リン酸水素二カリウム緩衝液(pH7.0)に溶解し、これにN,N-ジメチルホルムアミドに溶解している2.5％マレイミドベンゾイル-Ｎ-ヒドロキシサクシニミドエステル(MBS)(ピアース社製)溶液150μLを加え室温で撹拌しながら30分間反応させた。これを、4℃下で、10mMリン酸二水素カリウム-リン酸水素二カリウム緩衝液(pH7.0)で平衡化しておいたゲル濾過カラム（セファデックスG-25(Sephadex G-25)カラム(ファルマシア-エルケービー社製)）に通し、280nmにおける吸光度でモニターして、MBS-担体結合成分を分取した。このMBS-担体結合成分をリン酸三ナトリウムでpH7.0に調整し、これに実施例2で合成したペプチド「Cys Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys」（配列番号:3）を添加混合して150分間反応させた。反応後、水に対して3回透析した後、凍結乾燥を行って前記ペプチドと結合した担体よりなる免疫原を得た。

【００９１】

〔実施例４〕ブタHMGB-1とHMGB-2の調製

ブタの胸腺より、ブタHMGB-1（配列番号:4）及びブタHMGB-2（配列番号:5）をサンダースらの方法(C. Sanders et al., BBRC (1977) 78: 1034-42)に従って調製した。

（1）ブタの胸腺500gを、140mMの塩化ナトリウム及び0.5mMのPMSFを含む600mLの緩衝液中で破砕を行った。

（2）次に、この破砕物を遠心分離機で遠心分離を行い、その上澄み液を除去した。

（3）これに、140mMの塩化ナトリウム及び0.5mMのPMSFを含む緩衝液を加えて撹拌した後、遠心分離機で遠心分離を行い、その上澄み液を除去した。この洗浄操作を2回繰り返して行った。

（4）次に、得られた沈殿物に、0.75Mの過塩素酸300mLを加えた。そして、遠心分離機で遠心分離した後、上澄み液を分取した。残った沈殿物に0.75Mの過塩素酸400mLを加えた。これについても、遠心分離機で遠心分離した後、上澄み液を分取した。この上澄み液と先に分取した上澄み液とを合わせた。なお、沈殿物は廃棄した。

（5）前記の合わせた上澄み液に0.75Mの過塩素酸を加えて、全体の容量を1,000mLとした。次に、遠心分離機で遠心分離した後、上澄み液をグラスフィルター（グレード4）で濾過した。

（6）前記の濾過の濾液に、3,500mLのアセトンと21mLの濃塩酸の混合液を加えた。濁りが生じてくるので、遠心分離機で遠心分離して、上澄み液を分取した。この上澄み液に、アセトン2,500mLを加えた。そして、再度、濁りが生じてくるので、これを遠心分離機で遠心分離して、上澄み液を分離し、残った沈殿物を集めた。

（7）この集めた沈殿物を室温で自然乾燥させた。

以上の操作により、HMGB-1及びHMGB-2を含むタンパク質画分が、およそ20mg得られた。

（8）前記のHMGB-1及びHMGB-2を含むタンパク質画分を、200mM塩化ナトリウム を含む7.5mMホウ酸ナトリウム緩衝液(pH9.0)の10mLに溶解した後、この200mM塩化ナトリウムを含む7.5mMホウ酸ナトリウム緩衝液(pH9.0)で充分に透析を行った。

（9）この透析の後、7.5mMホウ酸ナトリウム緩衝液(pH9.0)で平衡化しておいたCM-セファデックスC25のカラムに添加した。そしてその後、200mM塩化ナトリウムを含む7.5mMホウ酸ナトリウム緩衝液(pH9.0)により溶出させて、陽イオン交換クロマトグラフィーを行った。

（10）そして、15％SDS-ポリアクリルアミド電気泳動の結果、その移動度より、図1において「A」で示した溶出画分及び「B」で示した溶出画分はブタHMGB-1を含む画分であり、更に「C」で示した溶出画分及び「D」で示した溶出画分はブタHMGB-2を含む画分であることが確かめられた。

（11）よって、図1において「A」で示した溶出画分及び「B」で示した溶出画分を混合して集め、更に「C」で示した溶出画分及び「D」で示した溶出画分を混合して集めた。

【００９２】

〔実施例５〕ヒトHMGB-1とHMGB-2の調製

ヒトHMGB-1（配列番号:6）及びHMGB-2（配列番号:7）を文献(P. Cabart et al. Cell Biochemistry and Function 13; 125-133: 1995)に従ってHL60細胞から精製した。

（1）HL60 cellを300mLの10%の非動化したFCS(牛胎児血清:ギブコ)を含んだRPMI1640(ギブコ)にて一週間ほど培養した。

（2）培養したHL60細胞を回収し、RPMI1640にて洗浄後、3LのPFHM-II(インビトロゲン)にて二週間ほど培養を行った。

（3）次にこの培養上清を、PBSにて平衡化されたHeparin-Sepharose(シグマ社)に通した。

（4）PBSにてよく洗浄後、0.5 Mの塩化ナトリウムを含んだPBSにて溶出を行った。この溶出を280nmの吸収にてモニタリングし、吸収のある部分をプールした。このプールを5mMホウ酸緩衝液(pH9.0) 0.2M 塩化ナトリウムにてよく透析を行った。

この透析したプールを7.5mM ホウ酸緩衝液(pH9.0)で平衡化されたCM-SehadexC25(Pharmacia)に添加した。そしてその後、200mM塩化ナトリウムを含む7.5mMホウ酸ナトリウム緩衝液（pH9.0）により溶出させた。結果は実施例4で示したものと同様である。

【００９３】

〔実施例６〕ポリクローナル抗体の調製

実施例4で調製した免疫原ブタHMGB-1を用いてポリクローナル抗体の調製を下記のようにして行った。

〔１〕動物への免疫

（1）前記の実施例4で得た免疫原ブタHMGB-1を100μg/mLになるように生理食塩水（0.9%塩化ナトリウム水溶液）で溶解し、これをフロイント完全アジュバントと等量ずつ混合してエマルジョンとして、ニワトリ（旭テクノグラス社）の羽の付け根に0.5mLを注射した。

（2）初回免疫から2週間後に、前記の免疫原を100μg/mLになるように生理食塩水で溶解し、これをフロイント不完全アジュバントと等量ずつ混合してエマルジョンとして、その0.5mLを追加注射を行った。この追加注射は2週間おきに行った。

（3）免疫動物であるこのニワトリの血清中及び卵黄中の抗体価を、酵素免疫測定法（ELISA，EIA）にて、初回免疫から6週間目より1週間ごとに測定した。このELISA法の操作を以下に示した。

（3-1）ブタHMGB-1を1μg/mLになるように生理食塩水に溶解し、これを96ウェル-マイクロプレート（ヌンク社製）に1ウェル当り100μLずつ加え、37℃で2時間静置してこのブタHMGB-1の固相化を行った。

（3-2）このマイクロプレートを洗浄液（0.05%ツイーン20(Tween20)を含むリン酸緩衝生理食塩水（5.59mMリン酸水素二ナトリウム、1.47mMリン酸二水素カリウム、137mM塩化ナトリウム及び2.68mM塩化カリウムを含む水溶液(pH7.2)））で洗浄した後、1%BSAを含む10mMリン酸二水素カリウム-リン酸水素二カリウム緩衝液（pH7.2）を1ウェル当り300μLずつ加えて、37℃で2時間静置してブロッキングを行い、その後再び洗浄液で洗浄した。

（3-3）抗体の産生を検査すべき前記ニワトリ卵黄100μLを生理食塩水900μLに溶解し、さらにそれを生理食塩水で1000倍、10000倍、そして100000倍と希釈し、これらをマイクロプレートのウェルに100μLずつ加え、37℃で2時間静置して反応を行わせた。その後洗浄液で洗浄した。

（3-4）また対照として、前記(3-2)のマイクロプレートのウェルに、1%BSAを含む0.1Mリン酸緩衝生理食塩水を100μLずつ加え、37℃で2時間静置して、その後洗浄液で洗浄した。

（3-5）パーオキシダーゼ(POD)標識抗ニワトリIgY抗体(Up-Data社製）を3%BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水で5000倍に希釈した後、(3-3)及び(3-4)のマイクロプレートに1ウェル当り100μLずつ加え、37℃で2時間静置して反応を行わせた。

（3-6）これを洗浄液で洗浄した後、パーオキシダーゼ反応液（3mM 2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸）（ABTS）を含む50mMリン酸水素二ナトリウム-24mMクエン酸緩衝液の1mLに対して2μLの1.7%過酸化水素を使用直前に添加したもの）を1ウェル当り100μLずつ加え、室温で反応させた。15分後に1ウェル当り150μLの6N硫酸を加えて反応を停止させた。

（3-6）これをEIAプレートリーダー（バイオラッド社製）にて415nmにおける吸光度の測定を行った。

（4）初回免疫から12週間目以降、抗体価がプラトーに達したと認められたので、この免疫動物であるニワトリの卵黄より抗体(IgY)を得た。

（5）卵黄10mLにTBS(0.14M NaCl，0.01M Tris/HCl，pH7.4，0.01%NaN_3)40mLを加え、よく攪拌後、遠心分離を行い上清を得た。

（6）次にこの上清に7.5mL $CaCl_2$，3mL デキストラン硫酸(10%(W/V)デキストラン硫酸in TBS)を加え30分間ほど攪拌後、遠心分離を行い上清と沈殿を得た。上清を回収し、沈殿を再度TBSにて再抽出した。遠心分離後再度得られた上清を前回の上清と合わせてTBSにて100mLにした。

（7）これに無水硫酸ナトリウムを20g添加し、30分間攪拌後、遠心分離を行い上清を除去した後、沈殿を10mL TBSに溶解し、PBSを加え、さらにPBSにて透析を行いグロブリン分画

を得た。
（8）次にこれを実施例4で調製したブタHMGB-1を固定化したカラムに通して、アフィニティークロマトグラフィーを行った。この操作を以下に示した。
（8-1）実施例4で調製したブタHMGB-14mgに対して2gのCNBr-セファロース（ファルマシアバイオテック社製）をその取扱説明書に従って反応させ、前記のペプチドを固定化したアフィニティークロマトグラフィー用のカラムを調製した。
（8-2）このカラムをリン酸緩衝生理食塩水で平衡化しておき、その後、前記(7)にて濃縮した成分（ポリクローナル抗体）を通した。
（8-3）これにリン酸緩衝生理食塩水を充分に通して洗浄した後、0.1Mの酢酸緩衝液（pH3.0）を通した。
（8-4）これにより溶出した画分を集め、リン酸緩衝生理食塩水で透析を行い、その後、濃縮を行った。
　以上のアフィニティークロマトグラフィーの操作により、ブタHMGB-1に結合するポリクローナル抗体を分取した。
（9）以上の操作により得られたニワトリの抗ブタHMGB-1ポリクローナル抗体は、ヒトHMGB-1,2に結合することができるものである。今回の場合はアフィニティー精製を行った抗体を調製したが、アフィニティー精製をしなくてもよい。
【００９４】
〔実施例７〕ヒトハイモビリティーグループ1に結合するが、ヒトハイモビリティーグループ2に結合しない抗体
　ヒトHMGB-1に結合するがヒトHMGB-2には結合しないポリクローナル抗体の調製を下記のように行なった。
実施例6で調製したポリクローナル抗体を実施例4で調製したブタHMGB-2を固定化したカラムに通して、HMGB-2に反応する抗体の吸収を行った。この操作を以下に示した。
（1）実施例4で調製したブタHMGB-24mgに対して2gのCNBr-セファロース（ファルマシアバイオテック社製）をその取扱説明書に従って反応させ、前記のHMGB-2を固定化したHMGB-2吸収用のカラムを調製した。
（2）このカラムをリン酸緩衝生理食塩水で平衡化しておき、その後、実施例6にて濃縮した成分（ポリクローナル抗体）を通した。
（3）素通りした画分を集め、リン酸緩衝生理食塩水で透析を行い、その後、濃縮を行った。
　以上のアフィニティークロマトグラフィーの操作により、ブタHMGB-1に結合するがブタHMGB-2には結合しないポリクローナル抗体を分取した。以上の操作により得られたニワトリの抗ブタHMGB-1ポリクローナル抗体は、ヒトHMGB-1に結合するがヒトHMGB-2には結合しないものである。
【００９５】
〔実施例８〕抗HMGB-1ポリクローナル抗体のペプチドへの反応性
　実施例3で調製されたペプチド抗原に対する実施例6で調製された抗ブタHMGB-1ポリクローナル抗体の反応性を確認をした。
（1）実施例3で得たペプチド抗原を1μg/mLになるように生理食塩水に溶解し、これを96ウェル-マイクロプレート（ヌンク社製）に1ウェル当り100μLずつ加え、37℃で2時間静置してこのペプチド抗原の固相化を行った。
（2）このマイクロプレートを洗浄液（0.05％ツイーン20（Tweeb20）を含むリン酸緩衝生理食塩水（5.59ｍＭリン酸水素二ナトリウム、1.47mMリン酸二水素カリウム、137mM塩化ナトリウム及び2.68ｍＭ塩化カリウムを含む水溶液(pH7.2)））で洗浄した後、1％BSAを含む10mMリン酸二水素カリウム-リン酸水素二カリウム緩衝液（pH7.2）を1ウェル当り300μLずつ加えて、37℃で2時間静置してブロッキングを行い、その後再び洗浄液で洗浄した。
（3）抗体の産生を検査すべき前記ニワトリ卵黄100μLを生理食塩水900μLに溶解し、さらにそれを生理食塩水で1000倍、10000倍、そして100000倍と希釈し、これらをマイクロ

プレートのウェルに100μLずつ加え、37℃で2時間静置して反応を行わせ、その後洗浄液で洗浄した。
（4）また対照として、前記(2)のマイクロプレートのウェルに、1％BSAを含む0.1Mリン酸緩衝生理食塩水を100μLずつ加え、37℃で2時間静置して、その後洗浄液で洗浄した。
（5）パーオキシダーゼ(POD)標識抗ニワトリIgY抗体（Up-Data社製）を3％BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水で5000倍に希釈した後、(3)及び(4)のマイクロプレートに1ウェル当り100μLずつ加え、37℃で2時間静置して反応を行わせた。
（6）これを洗浄液で洗浄した後、パーオキシダーゼ反応液（3mM 2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸）（ABTS）を含む50mMリン酸水素二ナトリウム-24mMクエン酸緩衝液の1mLに対して2μLの1.7％過酸化水素を使用直前に添加したもの）を1ウェル当り100μLずつ加え、室温で反応させた。15分後に1ウェル当り50μLの6N硫酸を加えて反応を停止させた。
（7）これをEIAプレートリーダー（バイオラッド社製）にて415nmにおける吸光度の測定を行った。
　その結果を図2に示す。希釈倍率が高いほどシグナルが高かった。このことから明らかにHMGB-1で得たポリクローナル抗体の中にはペプチド抗原に対する抗体が含まれていることがわかった。
【００９６】
〔実施例９〕ポリクローナル抗体の調製
　実施例3で調製した免疫原ペプチド抗原を用いてポリクローナル抗体の調製を下記のようにして行った。
〔１〕動物への免疫
（1）前記の実施例2で得た免疫原(「Cys Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys」（配列番号:3）で表されるペプチドにBSAを結合させたものを100μg/mLになるように生理食塩水（0.9％塩化ナトリウム水溶液）で溶解し、これをフロイント完全アジュバントと等量ずつ混合してエマルジョンとして、ニワトリ（旭テクノグラス社）の羽の付け根に0.5mLを注射した。
（2）初回免疫から2週間後に、前記の免疫原を100μg/mLになるように生理食塩水で溶解し、これをフロイント不完全アジュバントと等量ずつ混合してエマルジョンとして、その0.5mLにより追加免疫注射を行った。この追加免疫注射は2週間おきに行った。
（3）免疫動物であるこのニワトリの血清中及び卵黄中の抗体価を、酵素免疫測定法（ELISA,EIA）にて、初回免疫から6週間目より1週間ごとに測定した。このELISA法の操作を以下に示した。
（3-1）実施例3で得たペプチドにKLHを結合させたものを1μg/mLになるように生理食塩水に溶解し、これを96ウェル-マイクロプレート（ヌンク社製）に1ウェル当り100μLずつ加え、37℃で2時間静置してこのペプチド-KLHの固相化を行った。
（3-2）このマイクロプレートを洗浄液（0.05％ツイーン20（Tween20）を含むリン酸緩衝生理食塩水（5.59mMリン酸水素二ナトリウム、1.47mMリン酸二水素カリウム、137mM塩化ナトリウム及び2.68mM塩化カリウムを含む水溶液（pH7.2）））で洗浄した後、1％BSAを含む10mMリン酸二水素カリウム-リン酸水素二カリウム緩衝液（pH7.2）を1ウェル当り300μLずつ加えて、37℃で2時間静置してブロッキングを行い、その後再び洗浄液で洗浄した。
（3-3）抗体の産生を検査すべき前記ニワトリ卵黄100μLを生理食塩水900μLに溶解し、さらにそれを生理食塩水で1000倍、10000倍、そして100000倍と希釈し、これらをマイクロプレートのウェルに100μLずつ加え、37℃で2時間静置して反応を行わせ、その後洗浄液で洗浄した。
（3-4）また対照として、前記(3-2)のマイクロプレートのウェルに、1％BSAを含む0.1Mリン酸緩衝生理食塩水を100μLずつ加え、37℃で2時間静置して、その後洗浄液で洗浄した。
（3-5）パーオキシダーゼ(POD)標識抗ニワトリIgY抗体(Up-Data社製）を3％BSAを含むリ

ン酸緩衝生理食塩水で5000倍に希釈した後、(3-3)及び(3-4)のマイクロプレートに1ウェル当り100μLずつ加え、37℃で2時間静置して反応を行わせた。
（3-6）これを洗浄液で洗浄した後、パーオキシダーゼ反応液（3mM 2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸）(ABTS)を含む50mMリン酸水素二ナトリウム-24mMクエン酸緩衝液の1mLに対して2μLの1.7%過酸化水素を使用直前に添加したもの）を1ウェル当り100μLずつ加え、室温で反応させた。15分後に１ウェル当150μLの6N硫酸を加えて反応を停止させた。
（3-7）これをEIAプレートリーダー（バイオラッド社製）にて415nmにおける吸光度の測定を行った。
（4）初回免疫から12週間目以降、抗体価がプラトーに達したと認められたので、この免疫動物であるニワトリの卵黄より抗体(IgY)を得た。
（5）卵黄10mLにTBS(0.14M NaCl, 0.01M Tris/HCl, pH7.4, 0.01%NaN_3)40mLを加え、よく攪拌後、遠心分離を行い上清を得た。
（6）次にこの上清に7.5mL $CaCl_2$, 3mL デキストラン硫酸(10%(W/V)デキストラン硫酸in TBS)を加え30分間ほど攪拌後、遠心分離を行い上清と沈殿を得た。上清を回収し、沈殿を再度TBSにて再抽出した。遠心分離後再度得られた上清を前回の上清と合わせてTBSにて100mLにした。
（7）これに無水硫酸ナトリウムを20g添加し、30分間攪拌後、遠心分離を行い上清を除去した後、沈殿を10mL TBSに溶解し、PBSを加え、さらにPBSにて透析を行いグロブリン分画を得た。
（8）次に、これを実施例2で調製したペプチドを固定化したカラムに通して、アフィニティークロマトグラフィーを行った。この操作を以下に示した。
（8-1）実施例2で調製したペプチド10mgに対して2gのCNBr-セファロース（ファルマシアバイオテック社製）をその取扱説明書に従って反応させ、前記のペプチドを固定化したアフィニティークロマトグラフィー用のカラムを調製した。
（8-2）このカラムをリン酸緩衝生理食塩水で平衡化しておき、その後、前記(7)にて濃縮した成分（ポリクローナル抗体）を通した。
（8-3）これにリン酸緩衝生理食塩水を充分に通して洗浄した後、0.1Mの酢酸緩衝液（pH3.0）を通した。
（8-4）これにより溶出した画分を集め、リン酸緩衝生理食塩水で透析を行い、その後、濃縮を行った。
　以上のアフィニティークロマトグラフィーの操作により、ペプチドに結合するポリクローナル抗体を分取した。
（9）以上の操作により得られたニワトリのポリクローナル抗体は、ヒトHMGB-1に結合することができるものである。また、ヒトHMGB-1と相同性の高いヒトHMGB-2とは結合できないものであった。
　今回の場合はアフィニティー精製を行った抗体を調製したが、アフィニティー精製を行わなかった抗体でも適切な量を使用すれば同様の効果が期待できた。
【００９７】
〔実施例１０〕抗ペプチドポリクローナル抗体のヒトHMGB-1及びヒトHMGB-2との反応性の確認
　実施例9で調製した抗ペプチドポリクローナル抗体のヒトHMGB-1,2に対する反応性をウエスタンブロット法により確かめた。
１．ウエスタンブロット法
実施例9で調製した抗ペプチドポリクローナル抗体の反応性
（1）実施例5で得られたヒトHMGB-1(1mg/mL)及びHMGB-2(1mg/mL)を1:1に混合し、さらにサンプルバッファーと1:1で混合した。
（2）このサンプルを15% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。
そして、泳動緩衝液としてバルビタール緩衝液（pH8.8）を使用して、電流20mAで180分間通電して電気泳動を行った。

（3）前記(2)の電気泳動の後の転写は、ノバ・ブロット・エレクトロフォレティック・トランスファー・キット（ファルマシアーエルケービー社製）を用いて、その使用説明書に従い、ドライ方式で行った。まず、前記(2)において電気泳動を行ったゲルを転写用装置上に置いた。次に、このゲルの上に、9cm×9cmのニトロセルロース膜（バイオラッド社製）を重ね、48mMトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、39mMグリシン、0.0357％(W/V)ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)及び20％(V/V)メタノールよりなる転写用緩衝液を用いて、電流60mAで2時間転写を行った。

（4）この転写を行ったニトロセルロース膜を、1％BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水（5.59mMリン酸水素二ナトリウム、1.47mMリン酸二水素カリウム、137mM塩化ナトリウム及び2.68mM塩化カリウムを含む水溶液(pH7.2)）の20mLに4℃で1晩浸漬して、ブロッキングを行った。

（5）次に、これを洗浄液（0.05％ツイーン20（Tween20）を含むリン酸緩衝生理食塩水）の20ｍＬ中で10分間振とう洗浄を行った。この操作を3回行った。

（6）実施例9で調製したポリクローナル抗体80μｇを20mLの1%BSAを含んだリン酸緩衝生理食塩水に溶解し、この溶液に前記(5)の操作を行ったニトロセルロース膜を室温で2時間浸漬して反応させた。

（7）前記(6)の操作を行ったニトロセルロース膜を、20mLの洗浄液中で10分間振とう洗浄を行った。これを3回行った。

（8）次に、パーオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体（ダコ社製）を、3％BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水で500倍希釈をして、20mLの溶液を調製し、これに前記(7)のニトロセルロース膜を室温で2時間浸漬して反応させた。

（9）このニトロセルロース膜を、20mLの洗浄液中で10分間振とう洗浄を行った。この操作を3回行った。

（10）0.025％の3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩及び0.01％過酸化水素を含むリン酸緩衝生理食塩水の20mLに、前記(9)のニトロセルロース膜を室温で15分間浸漬して発色させた。

以上の操作により、実施例9で調製したポリクローナル抗体におけるウエスタンブロット法の結果を得た。

【００９８】

２．実験結果

（1）ウエスタンブロット法の結果

前記のポリクローナル抗体のウエスタンブロット法の結果を図3に示した。なお、この図において、「1」はポリクローナル抗体（実施例9で調製したポリクローナル抗体）における結果である。そして「2」はパーオキシダーゼ標識抗ニワトリIgY抗体(Up-Data社製)のみを反応させた結果である。「3」は実施例6で得られた抗ブタHMGB-1ポリクローナル抗体を反応させることにより、ヒトHMGB-1、2の位置を明らかにしたことを示す。図3より、「2」のポリクローナル抗体を作用させていないパーオキシダーゼ標識抗ニワトリIgY抗体のみを作用させた対照（コントロール）においては、ヒトHMGB-1のバンドが現れる位置及びヒトHMGB-2のバンドが現れる位置のいずれにおいても何ら発色は認められなかった。このことより、前記の各ウエスタンブロット法においては、非特異的な発色が起きていないことが確かめられた。「1」の実施例9で調製したポリクローナル抗体では、ヒトHMGB-1が泳動される位置には発色が見られるものの、ヒトHMGB-2が泳動される位置には発色が見られないことが分かる。このことから実施例9で調製された抗ペプチドポリクローナル抗体はヒトHMGB-1には反応するがヒトHMGB-2には反応しないことが明らかになった。

【００９９】

〔実施例１１〕モノクローナル抗体の調製

本発明において使用可能なモノクローナル抗体は、以下の操作により取得することができる。実施例5で調製した免疫原ヒトHMGB-1を用いてモノクローナル抗体の作成を下記のようにして行った。

1.動物への免疫

前記の実施例5で得た免疫原ヒトHMGB-1を100μg/mLになるように生理食塩水（0.9%塩化ナトリウム水溶液）で溶解し、これをフロイント完全アジュバントと等量ずつ混合してエマルジョンとして、8週齢のメスのBALB/cマウス(日本チャールズリバー社)の腹部皮下に0.5mLを注射した。初回免疫から2週間後に、前記の免疫原を100μg/mLになるように生理食塩水で溶解し、これをフロイント不完全アジュバントと等量ずつ混合してエマルジョンとして、その0.5mLにより追加注射を行った。この追加注射は2週間おきに行った。免疫動物であるこれらマウスの抗体価を、酵素免疫測定法（ELISA、EIA）にて、初回免疫から6週間目より1週間ごとに測定した。ELISA法の具体的操作については、下記(1)において詳述する。初回免疫から18週間目以降、抗体価がプラトーに達したと認められたので、免疫動物であるこれらマウスの腹部皮下に、生理食塩水で800μg/mLとした実施例5で得たヒトHMGB-1の0.5mLを注射した。その後3日目に、これらマウスより脾臓を取得した。

【０１００】

(1)ELISA法

ヒトHMGB-1を1μg/mLになるように生理食塩水に溶解し、これを96ウェル-マイクロプレート（ヌンク社製）に1ウェル当り100μLずつ加え、37℃で2時間静置してこのヒトHMGB-1の固相化を行った。このマイクロプレートを洗浄液（0.05%ツイーン20（Tween20）を含むリン酸緩衝生理食塩水（5.59mMリン酸水素二ナトリウム、1.47mMリン酸二水素カリウム、137mM塩化ナトリウム及び2.68mM塩化カリウムを含む水溶液（pH7.2）））で洗浄した後、1%BSAを含む10mMリン酸二水素カリウム-リン酸水素二カリウム緩衝液（pH7.2）を1ウェル当り300μLずつ加えて、37℃で2時間静置してブロッキングを行い、その後再び洗浄液で洗浄した。抗体の産生を検査すべき前記マウスの血清を試料として100μLを生理食塩水900μLに溶解し、さらにそれを、生理食塩水で1000倍、10000倍、そして100000倍と希釈し、これらをマイクロプレートのウェルに100μLずつ加え、37℃で2時間静置して反応を行わせ、その後洗浄液で洗浄した。また対照として、マイクロプレートのウェルに、マウス血清に代えて1%BSAを含む0.1Mリン酸緩衝生理食塩水を100μLずつ加え、37℃で2時間静置して、その後洗浄液で洗浄した。パーオキシダーゼ（POD）標識抗マウスIgG抗体(アマシャム社製）を3%BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水で5000倍に希釈した後、各マイクロプレートに１ウェル当り100μLずつ加え、37℃で2時間静置して反応を行わせた。これを洗浄液で洗浄した後、パーオキシダーゼ反応液（3mM 2,2’-アジノ-ビス(3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸）(ABTS)を含む50mMリン酸水素二ナトリウム-24mMクエン酸緩衝液の1mLに対して2μLの1.7%過酸化水素を使用直前に添加したもの）を1ウェル当り100μLずつ加え、室温で反応させた。15分後に1ウェル当り150μLの6N硫酸を加えて反応を停止させた。これをEIAプレートリーダー（バイオラッド社製）にて415nmにおける吸光度の測定を行った。

【０１０１】

2.骨髄腫細胞の増殖

BALB/cマウス由来のヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシル・トランスフェラーゼ欠損の骨髄腫細胞株であるP3-X63-Ag8-U1株（癌研究リサーチソースバンク 9085）を、胎生ウシ血清を10%含有しグルタミン、ペニシリン及びストレプトマイシンを補ったRPMI1640組織培養培地（バイオセル社製）で増殖を行った。より詳細には、この骨髄腫細胞を細胞培養用中型ボトル（ヌンク社製、200mL容）内で、ボトルの底面の約8割を細胞が占めるまで増殖させた。なお、細胞数は、トリパン青染料排除法及び血球計で計数した。

【０１０２】

3.細胞融合

前記1.で免疫動物のマウスより取得した脾臓を、ステンレススチールメッシュ#200を使用して充分にほぐし、血清を含まないRPMI1640培地で洗浄しながら濾過した。その後、200gで遠心分離を行い、脾臓細胞を分離した。更に、再度血清を含まないP3-X63-Ag8-U1株骨髄腫細胞を5対1の割合で混合した後、遠心分離を行った。混合した細胞を、ポリエチレングリコール1500（PEG1500、ロシュ・ダイアグノスティック社製）を50%含むRPMI1640培地にゆっくりと懸濁した。そして、最終的にポリエチレングリコール濃度が5%となる

ように、これをRPMI1640培地で徐々に希釈した。これより細胞を遠心分離で分離し、5％のハイブリドーマクローニングファクター（オリゲン社製）を含んだS-クローン培地（三光純薬社製）よりなる増殖培地に徐々に分散させた。そして、平底の96穴マイクロプレート（ヌンク社製）のウェルに、1ウェル当り10^6個／100μLの細胞数の細胞を植え、5％の二酸化炭素中37℃で培養した。細胞融合後１日目に、各ウェルに100μLのHAT培地（前記の増殖培地に0.01mMヒポキサンチン、1.6μMチミジン及び0.04μMアミノプテリンとなるようにそれぞれを補充したもの、いずれも東京化成社製）を加えた。その後3日間は、毎日、約半分のHAT培地を新しいHAT培地と交換し、更にその後は、2～3日ごとに同様の交換を行った。

【０１０３】

細胞を顕微鏡観察したところ、ハイブリドーマ（融合細胞）のクローンは10日以降より出現した。細胞融合後14日以降にヒトHMGB-1を認識する抗体の産生を検査するため、ウェル内の培養液をELISA法でスクリーニングした。なお、このELISA法の操作は、前記1.(1)と同じであった。スクリーニングにより、ヒトHMGB-1を認識する抗体を産生していることが判明したウェルのハイブリドーマを、24ウェルプレートに拡大して培養し、細胞密度が高くなるに従い、小型ボトル、中型ボトルとスケールを大きくして培養した。ハイブリドーマは、HT培地（アミノプテリン及びハイブリドーマクローニングファクターを含まないHAT培地）で培養、保持した。ヒトHMGB-1を認識する抗体の産生を1.(1)と同様のELISA法により調べたところ、かかるハイブリドーマを40個確認することができた。

【０１０４】

4.ハイブリドーマサブクローニング

ヒトHMGB-1に対する抗体を産生する前記ハイブリドーマの各々を、限界希釈法にてサブクローニングした。これらのハイブリドーマの細胞数を、トリパン青染料排除及び血球計により計数した。次に、これらのハイブリドーマを、100μLのHT培地当り、0.5個の生育細胞数の割合と1個の生育細胞数の割合の2種類の割合で懸濁し、96穴の平底マイクロプレートの1ウェル当り100μLずつ分注した。これを2～3日ごとに培地を交換して、ハイブリドーマを増殖させた。2週間後、顕微鏡下で各ウェルのコロニー数を調べ、そして、ブタHMGB-1に対する抗体を産生するハイブリドーマについて前記と同様にしてELISA法で調べた。1ウェル中に1コロニーが存在し、そしてこのような抗体を産生するハイブリドーマ（ウェル）を2個得ることができた。

【０１０５】

得られたハイブリドーマを24穴のプレートに移し、細胞生育が良好となるまで2週間培養した。次に、これらのハイブリドーマが産生する抗体の、実施例5で調製したヒトHMGB-1との反応性をELISA法により調べた。なお、このELISA法の操作は、96ウェル-マイクロプレートに固相化するタンパク質を実施例5で調製したヒトHMGB-1に変え、試料を各ハイブリドーマ（各ウェル）の培養上清に変えた以外は、前記の1.(1)と同様にして行った。

この結果、前記のハイブリドーマのうち、20個のハイブリドーマが、前記ヒトHMGB-1に結合する抗体を産生する細胞株であることが判明した。

【０１０６】

次に、このハイブリドーマが産生する抗体の、実施例5で調製したヒトHMGB-1、ヒトHMGB-2の各々との反応性をELISA法で調べた。なお、このELISA法の操作は、96ウェル-マイクロプレートに固相化するタンパク質を実施例5で調製したヒトHMGB-1又はヒトHMGB-2に変え、試料をこのハイブリドーマ（このウェルの培養上清）に変えた以外は、前記の1.(1)と同様にして行った。

この検討の結果、このハイブリドーマが産生する抗体として、ヒトHMGB-1には結合するが、ヒトHMGB-2には結合しないクローンも確かめられた。このハイブリドーマは、R08G12G2，R06G7E10と命名された。

【０１０７】

5.モノクローナル抗体の産生

前記4.で得た各々のモノクローナル抗体産生細胞株（ハイブリドーマ）を、それぞれ中

型ボトル（ヌンク社製）の中に1つずつ入れ、底面の約8割を細胞が占めるまでHT培地中で培養を行った。その後、これらのハイブリドーマをハーベストし、200g、5分間の遠心分離にて回収した。次に、これを血清を含まないRPMI1640培地液で3回洗浄した後、2mLのRPMI1640培地液に懸濁した。このハイブリドーマ懸濁液1mLを、予め2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン処置したオスのBALB／cマウス（日本チャールズリバー社）の腹腔に注射した。注射から2週間以内に腹部の膨張が認められなかった場合には、再度この操作を繰り返した。腹部の膨張が認められたマウス腹水を採取した。これを200g、5分間の遠心分離にかけ、ハイブリドーマから産生されたモノクローナル抗体を含む上澄み液を、ハイブリドーマから分離して取得した。

【０１０８】

6.モノクローナル抗体の精製

(1) モノクローナル抗体がIgGの場合

前記5.で得た、ハイブリドーマから産生されたモノクローナル抗体を含む上澄み液の各々の10mLに、22℃で硫酸ナトリウム1.8gを撹拌しながら加え、硫酸ナトリウムが完全に溶けてから更に1時間撹拌を続けて塩析を行った。これを22℃で遠心分離（7000g、15分間）を行い、上澄み液と分離して得た沈殿を、30mM塩化ナトリウムを含む40mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH8.0）2mLに溶解した。次に、これを30mM塩化ナトリウムを含む40mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH8.0）に対して充分に透析した後、1000gで20分間遠心分離し不溶性のものを除去した。これを30mM塩化ナトリウムを含む40mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH8.0）で平衡化しておいたDEAE-セルロースイオン交換カラム（セルバ社製）〔1×10cm〕に流速0.4mL／分で通して、溶出液を2mLずつ集めた。免疫グロブリンG（IgG）が溶出液の素通り画分に含まれていることを280nmの吸光度より確認し、これを集めて2mLに濃縮した。更に、これをプロテインＡ-セファロースCL-4Bアフィニティークロマトグラフィー（ファルマシア-エルケービー社製）にかけて精製を行い、精製したモノクローナル抗体を得た。

【０１０９】

(2)モノクローナル抗体がIgMの場合

前記5.で得た、ハイブリドーマから産生されたモノクローナル抗体を含む上澄み液の各々の10mLを20mM リン酸緩衝液(pH7.5) 0.8M 硫酸アンモニウムで十分に透析した。透析の終了した上澄み液を20mM リン酸緩衝液(pH7.5) 0.8M 硫酸アンモニウムにて平衡化されたHiTrap IgM purification HP 1mL(アマシャムバイオサイエンス)にかけた。十分に20mM リン酸緩衝液(pH7.5) 0.8M 硫酸アンモニウムにて洗浄後、20mM リン酸緩衝液(pH7.5)にて溶出した。これで精製されたIgMタイプのモノクローナル抗体を得た。

【０１１０】

〔実施例１２〕　モノクローナル抗体のヒトHMGB-1,2への反応性の検討

実施例5で調製したヒトHMGB-1,2に対する、モノクローナル抗体の反応性をウエスタンブロット法により確かめた。この場合クローンR06G7E10を例として述べる。他のクローンについても同様に検討を行った。

(1)実施例１１で調製したモノクローナル抗体の反応性（ウエスタンブロット法）

実施例5で得られたヒトHMGB-1(1mg/mL)及びHMGB-2(1mg/mL)を1:1に混合し、さらにサンプルバッファーと1:1で混合した。このサンプルを15% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。そして、泳動緩衝液としてバルビタール緩衝液（pH8.8）を使用して、電流20mAで180分間通電して電気泳動を行った。電気泳動の後の転写は、ノバ・ブロット・エレクトロフォレティック・トランスファー・キット（ファルマシア-エルケービー社製）を用いて、その使用説明書に従い、ドライ方式で行った。具体的には、まず、電気泳動を行ったゲルを転写用装置上に置いた。次に、このゲルの上に、9cm×9cmのニトロセルロース膜（バイオラッド社製）を重ね、48mMトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、39mMグリシン、0.0357％（W／V）ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）及び20％（V／V）メタノールよりなる転写用緩衝液を用いて、電流60mAで2時間転写を行った。

【０１１１】

転写を行ったニトロセルロース膜を、1％BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水（5.59mMリン

酸水素二ナトリウム、1.47mMリン酸二水素カリウム、137mM塩化ナトリウム及び2.68mM塩化カリウムを含む水溶液（pH7.2））の20mLに4℃で1晩浸漬して、ブロッキングを行った。次に、これを洗浄液（0.05％ツイーン20（Tween20）を含むリン酸緩衝生理食塩水）の20mL中で10分間振とう洗浄を行った。この操作を3回行った。実施例11で調製したモノクローナル抗体を20mLの1%BSAを含んだリン酸緩衝生理食塩水に80μg溶解し、前記洗浄したニトロセルロース膜を室温で2時間浸漬して反応させた。続いて膜を20mLの洗浄液中で10分間振とう洗浄を行った。これを3回行った。

【０１１２】

次に、パーオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体（ダコ社製）を、3％BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水で500倍希釈をして、20mLの溶液を調製し、これに前記ニトロセルロース膜を室温で2時間浸漬して反応させた。このニトロセルロース膜を、20mLの洗浄液中で10分間振とう洗浄を行った。この操作を3回行った。0.025％の3,3’-ジアミノベンジジン四塩酸塩及び0.01％過酸化水素を含むリン酸緩衝生理食塩水の20mLに、前記ニトロセルロース膜を室温で15分間浸漬して発色させた。以上の操作により、実施例11で調製したモノクローナル抗体におけるウエスタンブロット法の結果を得た。

【０１１３】

前記1のR06G7E10におけるウエスタンブロット法の結果を図4に示す。なお、この図において、「1」はパーオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体（ダコ社製）のみを反応させたもので、「2」はR06G7E10（実施例11で調製したモノクローナル抗体）を反応させたもので、「3」は実施例6で得られた抗ブタHMGB-1ポリクローナル抗体を反応させたものである。図4より、「1」のモノクローナル抗体を作用させていないパーオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体のみを作用させた対照（コントロール）においては、ヒトHMGB-１のバンドが現れる位置及びヒトHMGB-2のバンドが現れる位置のいずれにおいても何ら発色は認められなかった。このことより、前記の各ウエスタンブロット法においては、非特異的な発色が起きていないことが確かめられた。「2」の実施例11で調製したモノローナル抗体では、ヒトHMGB-１が泳動される位置には発色が見られるものの、ヒトHMGB-2が泳動される位置には発色が見られないことが分かる。

【０１１４】

〔実施例１３〕肺線維症における抗体の治療効果

（１）材料及び方法

1.実験個体群

本実験は、九州大学医学部の倫理委員会の許可を得て行われた。特発性肺線維症(IPF)及び分類不能な間質性肺炎(NSIP)の診断は、従来の分類法(非特許文献４)に基づいて行った。胸腔鏡肺生検検体を、8人のIPF患者及び全てのNSIP患者より得た。膠原病(collagen vascular diseases)を伴う間質性肺炎(CVD-IP)では、11件のリウマチ性関節炎、6件の多発筋炎／皮膚筋炎、2件のシェーグレン症候群、及び1件の進行性全身性硬化症が見られた。HPの診断は、従来の分類法(Richerson HB et al., J Allergy Clin Immunol (1989) 84: 839-44)に基づいて行った。全てのコントロールは、健康なボランティアであった。全てのケースについて、相反する診断結果とならないよう経気管支肺生検を得た。BALFの陰性培養、及び生検検体により、全ての患者についてその時点で細菌、ミコバクテリア、又は真菌に感染していないことを確認した。診断時及びステロイド治療前に、BALF及び血清を採取した。

【０１１５】

2.ブレオマイシン誘導肺疾患

本実験は、九州大学医学部の動物実験に関する倫理委員会の承認を得て、米国生理学学会(American Physiological Society)のガイドラインに従って行った。全ての実験について、7から8週齢の雄C57B1/6マウスを(株)KBTオリエンタル(日本)より入手して使用した。マウスの体重は20～25gであった。マウスは、ペントバルビタールナトリウム(Schering-Plough,米国)の腹膜内注射により麻酔した。麻酔したマウスに、滅菌塩水中に体重1kg当り3Uブレオマイシンを含む50μL塩酸ブレオマイシン(日本化薬(株))溶液を経気管支的に投

与した。ポリクローナルニワトリIgY抗HMGB-1 中和抗体は実施例6で作製したものである。コントロールのニワトリIgY抗体は、(株)シノテストより譲り受けた。中和抗体の用量は、以前の報告に基づいて決定した(Kim JY et al., Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol (2005) 288: L958-65)。抗HMGB-1中和抗体(200μg/匹)またはコントロールニワトリIgY抗体(200μg/匹)を、ブレオマイシン投与から5日後に腹膜内注射した。エチルピルビン酸用量は、以前の報告に基づいて決定した(Ulloa L et al., Proc Natl Acad Sci USA (2002) 99: 12351-6)。具体的には、エチルピルビン酸(EP)(40mg/kg)を、ブレオマイシン投与から3から13日後の間、毎日、腹腔内注射した。ブレオマイシン点滴から14日後にマウスを犠牲死させ、全血を採取した。右肺組織を緩衝剤中の10%フォルマリンで固定し、左肺組織は、液体窒素中で急速凍結し、-80℃で使用時まで保存した。

【０１１６】

3.気管支肺胞洗浄(BAL)手順

患者において、BALを既報に従って行った(Kuwano K et al., Chest (2000) 118: 451-8)。具体的には、BALは、総量150mLの滅菌生理食塩水溶液を用いて行った。まず、殺したマウスの気管切開をした。気管チューブを挿入後、気管を1mL容量の滅菌塩水で室温において2回洗浄した。回収した液体を、単層のガーゼで濾過し、根粘液を除去した。洗浄液中の細胞数を血球計数器を用いて数えた。Diff-Quick(Baxter Diagnostics)で染色した200の細胞についてBAL細胞を区別して数えた。洗浄液の上清は、HMGB-1についての測定まで-80℃において保存した。

【０１１７】

4.HMGB-1の免疫組織化学分析

3つの厚さ10^{-6}mのパラフィン切片を、ポリL-リシンで前処理したスライドに載せた。脱パラフィン化後、ヒストンファインSAB-POキット(ニチレイ)を用い、改変したストレプトアビジン-ビオチン化ペルオキシダーゼ技術により、免疫組織化学分析を行った。非特異的タンパク質染色は、ヤギ血清を加えて30分、室温においてインキュベートすることによりブロックした。切片を、抗HMGB-1抗体(Upstate, Lale Placid, NY)と4℃において一晩インキュベートした。コントロールとして、特異的抗体に代えて非免疫血清を用いインキュベーションを行った。切片をメチルグリーンで染色し、検鏡板に載せた。

【０１１８】

5.マウスにおける組織病理学

開胸後、肺循環器系を塩水で流し、肺を診査した。肺試料を10%フォルマリンで一晩かけて固定し、パラフィンに包埋した。中央矢状切片全領域における炎症及び線維化の病理段階を、倍率40倍で評価し、次の分類に従って決定した：0、肺異常なし；1、肺実質の25%未満に炎症及び線維化が存在；2、病変が肺の25～50%を占める；3、病変が肺の50%以上を占める。

【０１１９】

6.肺組織におけるDNA損傷及びアポトーシス

TUNEL陽性細胞の数は、本モデル動物における肺損傷及び線維化と相関がある(Kuwano K et al., J Clin Invest (1999) 104: 13-9; Maeyama T et al., Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol (2001) 280: L1128-37; Tsuburai T et al., Hum Gene Ther (2002) 13: 1945-60)。DNA損傷及びアポトーシスについて、DeadEnd Colorimetric Apoptosis Detection System (Promega, MI, USA)を用いてTUNEL法により、既報に従って評価した(Kuwano K et al., Lab Invest (2002) 82: 1695-706)。顕微鏡下、倍率200倍で、20のランダムに選択した視野について、各視野当りのTUNEL陽性細胞を計数した。

【０１２０】

7.HMGB-1についてのELISA

既報に従い、HMGB-1に対するモノクローナル抗体を用いてHMGB-1についてのELISAを行った(Yamada S et al., Clin Chem (2003) 49: 1535-7)。HMGB-1の最低検出限界は2μg/Lであった。

【０１２１】

8.コラーゲン分析

肺ホモジェネート中のコラーゲン濃度は、Sircor Collagen Assayキット(Biocolor, Northern Ireland, UK)を用いて既報に従って測定した(Kitani A et al., J Exp Med (2003) 198: 1179-88)。

【０１２２】

9.統計

BALF中のBAL細胞数、TUNEL陽性細胞、体重、及びELISAの結果の比較のための統計学的分析には、分散分析(analysis of variance; ANOVA)及びそれに引き続くScheffe F検定を用いた。病理段階の比較のためには、Kruskal-Wallis検定及びそれに引き続くMann-Whitney U検定を用いた。0.05よりも低いP値を有意と判断した。統計分析は、StatView J-4.5(Abacus Concepts Inc., Berkley, CA)を用いて行った。

【０１２３】

（２）結果

1.血清中のHMGB-1レベル及び間質性肺疾患におけるBALF

血清HMGB-1レベル(平均±SEM)は、IPFで3.7±1.9、NSIPで0.1±0.1、CVD-IPで0.8±0.5、HPで4.1±3.4、及びコントロールで0.5±0.3ng/mLであった。血清HMGB-1レベルについては、間質性肺疾患とコントロールとの間で有意な差は無かった(図5)。BALF HMGB-1レベル(平均±SEM)は、IPFで3.5±0.6、NSIPで4.9±2.4、CVD-IPで2.2±0.5、HPで9.4±4.2、及びコントロールで1.6±0.4ng/mLであった。BALF HMGB-1レベルは、コントロールと比べ、IPF及びHP患者において有意に高かった(各々、p＜0.05、p＜0.01)(図6)。

【０１２４】

2.IPF及びNSIP患者由来肺組織におけるHMGB-1発現

免疫組織化学分析の結果は、HMGB-1発現が、幾つかの肺胞マクロファージにおいて検出される以外、通常の肺実質においては検出されないことを示す。NSIPでは、肺胞壁の肺胞上皮及び炎症細胞、並びに肺胞マクロファージの核が陽性反応を示した。IPFでもこれらの細胞の核中、特に炎症領域が陽性を示した(図7)。

【０１２５】

3.ブレオマイシン誘導肺線維症におけるHMGB-1発現

免疫組織化学分析の結果、HMGB-1発現は、未処理マウスの幾つかの気管支上皮細胞の核で検出された。HMGB-1発現は、ブレオマイシン点滴から1日後、気管支上皮細胞でアップレギュレーションされた。5日後には、陽性シグナルは、気管支上皮細胞に加えて、肺胞上皮細胞及び炎症細胞においても見られた。7から14日目には、陽性染色された気管支上皮が減っているように見受けられたのに対し、陽性染色された肺胞上皮細胞及び炎症細胞は増加した。14日目には、陽性染色された細胞は、主に線維化領域において検出された(図8)。

【０１２６】

4.ブレオマイシン誘導肺線維症に対する中和抗HMGB-1抗体の効果

体重：14日目における体重は、ブレオマイシン点滴後、コントロール抗体で処理したマウスと比べて、抗HMGB-1抗体で処理したマウスにおいて有意に増加していた(図10a)。

組織学的所見：未処理マウスと比較して、ブレオマイシン点滴から7日目において、好中球及びリンパ球の浸潤により肺胞壁は肥厚し始めていた。14日目では、肺間質に多数のリンパ球が浸潤し、肺胞間中隔の肥厚、肺胞空間の崩壊及び線維芽細胞の増殖が観察された。抗HMGB-1抗体は、14日目において組織病理学的所見を和らげていた(図9a及びc)。組織学的分析の半定量分析により、コントロールと比べ抗HMGB01抗体が、14日目における病理段階を有意に低減することが示された(図10b)。

TUNEL染色：細胞型は明確には同定されなかったが、炎症領域における気管支及び肺胞上皮細胞、または炎症細胞は、ブレオマイシン点滴から14日後、DNA損傷及びアポトーシスの証拠を示した(図9b)。抗HMGB-1抗体は、14日目において、TUNEL陽性シグナル数を顕著に低減した(図9d及び図10c)。

コラーゲン濃度：肺ホモジェネート中のコラーゲン濃度は、コントロール抗体で処置し

たマウスと比べて、抗HMGB-1抗体で処理したマウスにおいて、有意に減少していた(図10d)。

BALF分析：BALF中の総細胞、マクロファージ、好中球、及びリンパ球の数は、14日目において、塩水を点滴したマウスと比べて、ブレオマイシンを点滴したマウスにおいて有意に増加していた。抗HMGB-1抗体が投与された場合、コントロール抗体で処理したマウスと比べて、14日目におけるBALF中の総細胞及び好中球の数は有意に減少していたのに対し、マクロファージ及びリンパ球の数については有意な変化は見られなかった(図11)。

【０１２７】

5.ブレオマイシン誘導肺線維症に対するエチルピルビン酸の効果

体重：14日目におけるマウスの体重は、コントロールと比べ、エチルピルビン酸で処理したものにおいて有意に増加していた(図12c)。

HMGB-1レベル：このモデルマウスにおいて、血清中のHMGB-1レベルは、エチルピルビン酸投与により変化し無かったが、BALF中のHMGB-1レベルは有意に減少した(図12a及びb)。

組織学的所見：エチルピルビン酸投与は、14日目における組織病理学的所見を、コントロールと比べ和らげていた。組織学分析の半定量分析により、エチルピルビン酸投与が、14日目における病理段階を有意に下げていることが示された(図12d)。

BALF分析：EP投与により、コントロールと比べ、BALF中の14日目における総細胞、好中球、及びリンパ球の数は、有意に減少していたのに対し、マクロファージ数は有意に変化していなかった(図13)。

【０１２８】

〔実施例１４〕HMGB-1の線維芽細胞増殖促進作用

（１）材料及び方法

(a)　アポトーシスアッセイ及び(c)コラーゲン産生アッセイ

ヒト肺線維芽細胞として、WI-38細胞（DS Pharma Biomedical (Osaka, Japan)）を用いた。WI-38細胞は、底面積75-cm^{2}の組織培養フラスコ（FALCON, Franklin Lakes, NJ)を用い、10% FBS MEM培地中で、37℃（5%二酸化炭素）にて培養した。 HMGB-1 10または30 ng/mL存在下あるいは非存在下にて24時間培養した後のWI-38細胞に関し、以下の評価を行った。

アポトーシスアッセイ： WI-38 細胞は、トリプシン/EDTA処理にてフラスコ底面より剥がして回収し、培養液中に浮遊していた細胞と併せ、アッセイに用いた。アポトーシスは、Annexin-V-FLUOS staining kit (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany)にて評価した。すなわち、 1 x 10^6 細胞をPBSで洗浄し、Annexin V-FITC及びPropidium iodideを含有したインキュベーションバッファー(10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$)に再懸濁した。氷上で20分間インキュベーションした後、 Coulter EPICS XL flow cytometer (Coulter, Miami, FL)にて蛍光強度を測定し、アポトーシスを起こした細胞の割合を解析した。

コラーゲン産生アッセイ：WI-38 細胞の培養上清を回収し、-80℃にて保存したサンプルをアッセイに用いた。Sircor Collagen Assay kit (Biocolor, Northern Ireland, UK)を用い、該培養上清中のコラーゲン濃度を測定した。

【０１２９】

(b)　細胞増殖アッセイ

ヒト肺線維芽細胞として、WI-38細胞（DS Pharma Biomedical (Osaka, Japan)）を用いた。WI-38細胞は、96穴組織培養プレートを用い、10% FBS MEM培地中で、37℃（5%二酸化炭素）にて培養した。 HMGB-1 10または30 ng/mL存在下あるいは非存在下にて24時間培養した後のWI-38細胞に関し、Tetra color ONE assay kit (SEIKAGAKU CORPORATION, Tokyo, Japan)を用い、WI-38細胞の増殖を評価した（各HMGB-1濃度につきN=8）。すなわち、tetra color ONE を添加し、37℃にて4時間インキュベーションした後、自動マイクロプレートリーダー (Easy Reader EAR 340; SLT-Lab instruments, Austria)にて、540 nmの吸光度を測定した。

【０１３０】

（２）結果

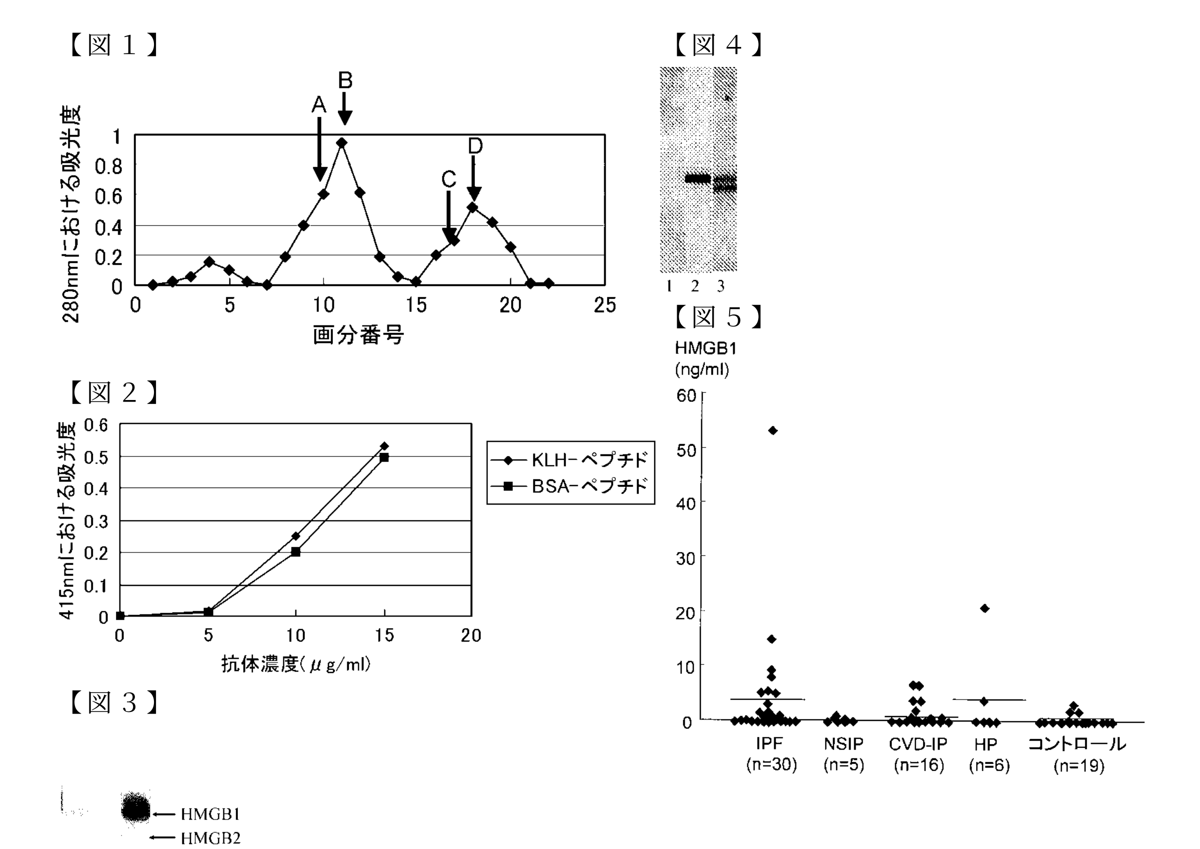
HMGB-1は、線維芽細胞の増殖を促進することが示された（図１４）。一方、線維芽細胞のアポトーシス誘導や、線維芽細胞からのコラーゲン産生には、HMGB-1は、影響を与えなかった（図１４）。

肺線維症においては、炎症が進行すると間質に線維芽細胞が増殖・浸潤してきて線維化が生じることが知られている。線維化がおこると肺胞隔壁は肥厚し固くなり、労作時の呼吸困難や咳などがつながりうる。本結果は、HMGB-1が線維芽細胞の増殖・浸潤に、HMGB-1が関与している可能性を示すものである。実施例13で示された抗HMGB-1中和抗体の効果のメカニズムの少なくとも一部として、抗HMGB-1中和抗体による線維芽細胞増殖抑制が関与している可能性が示唆された。

【産業上の利用可能性】

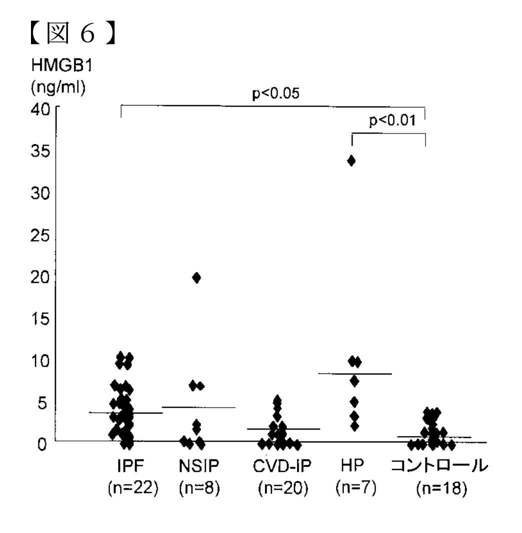
【０１３１】

本発明者らにより、抗HMGB-1抗体が、IPF等の間質性肺炎に起因する体重減少、肺組織の線維化等を阻害する有効であることが示された。そこで、本発明は、抗HMGB-1抗体を利用した、IPF等の間質性肺炎を含む間質性肺疾患を治療または予防する手段を提供するものである。

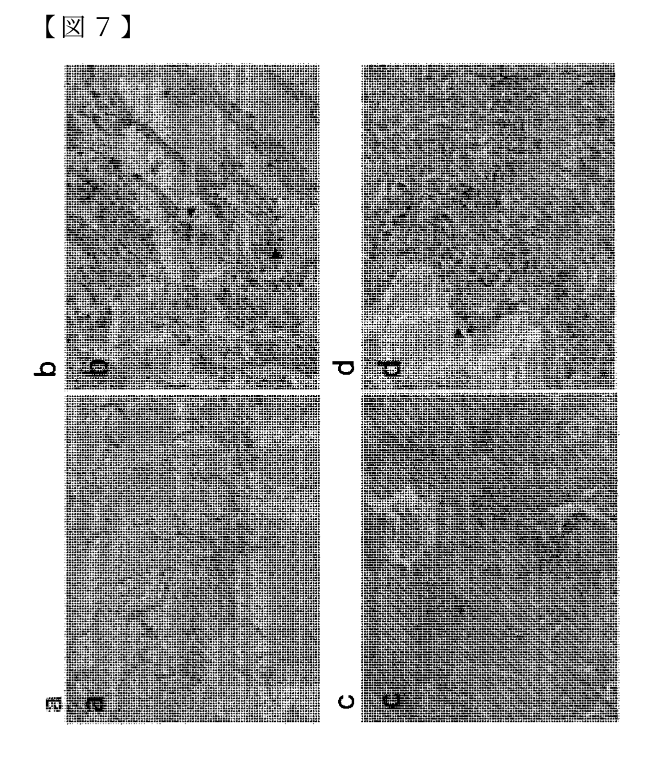


1　2　3

【図６】


HMGB1
(ng/ml)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
p<0.05
p<0.01
IPF
(n=22)
NSIP
(n=8)
CVD-IP
(n=20)
HP
(n=7)
コントロール
(n=18)

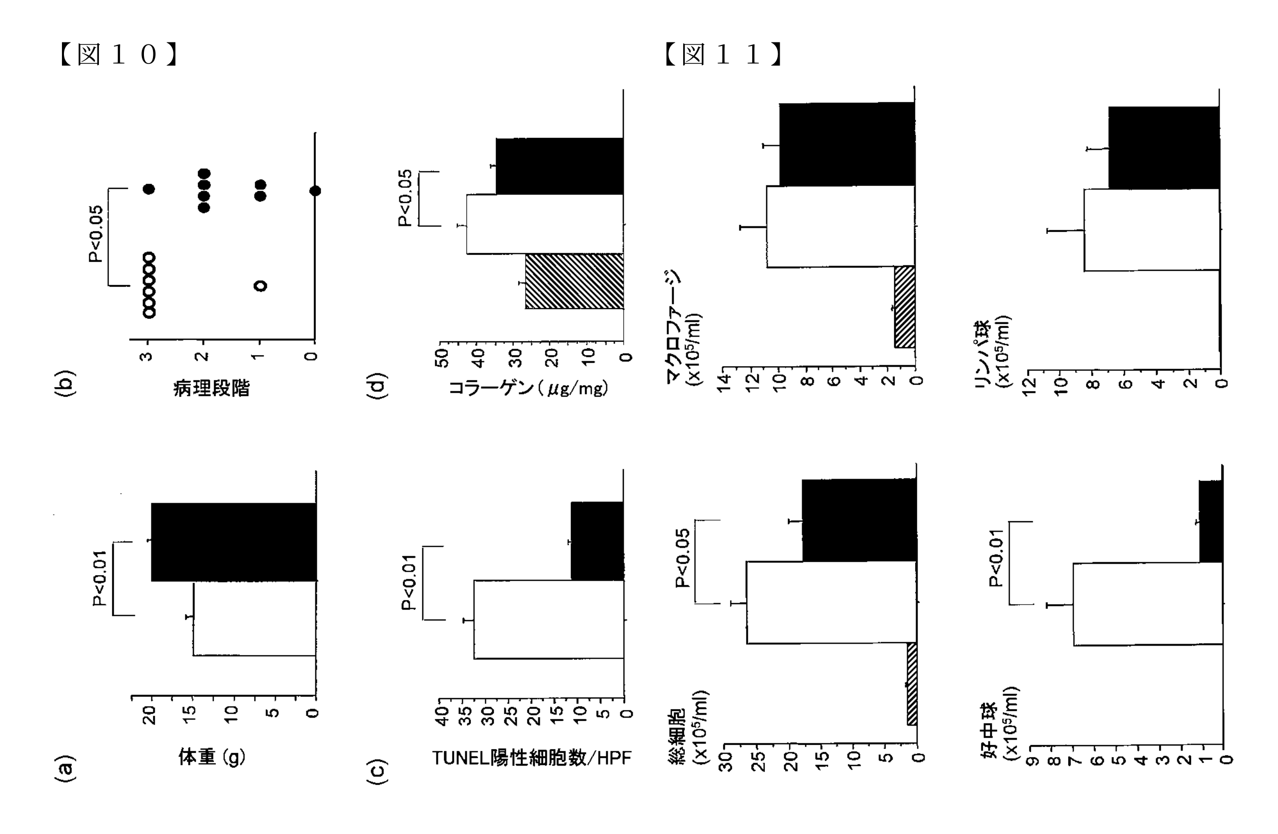
【図７】


a
b
c
d

【図８】

【図９】

【図１０】

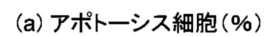


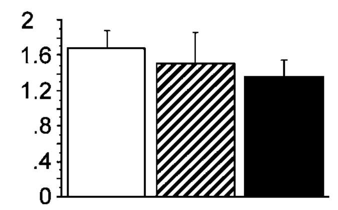
【図１１】

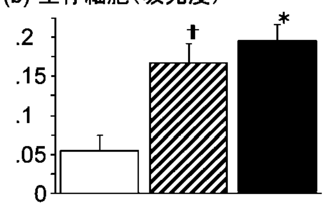
【図１２】

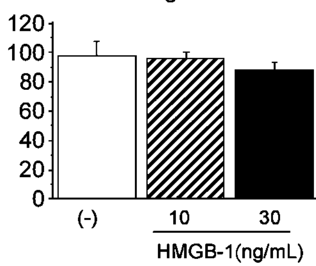
【図１３】

【図１４】









【配列表】
0005241518000001.app

フロントページの続き

(74)代理人　100119507
弁理士　刑部　俊
(74)代理人　100142929
弁理士　井上　隆一
(74)代理人　100148699
弁理士　佐藤　利光
(74)代理人　100128048
弁理士　新見　浩一
(74)代理人　100129506
弁理士　小林　智彦
(74)代理人　100130845
弁理士　渡邉　伸一
(74)代理人　100114340
弁理士　大関　雅人
(74)代理人　100121072
弁理士　川本　和弥
(72)発明者　桑野　和善
福岡県福岡市東区馬出３－１－１　九州大学大学院医学研究院附属胸部疾患研究施設内
(72)発明者　濱田　直樹
福岡県福岡市東区馬出３－１－１　九州大学大学院医学研究院附属胸部疾患研究施設内
(72)発明者　丸山　征郎
鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘８－３５－１　鹿児島大学大学院医歯学総合研究科内
(72)発明者　山田　晋吾
神奈川県相模原市大野台２－２９－１４　株式会社シノテスト内

審査官　上條　のぶよ

(56)参考文献　国際公開第２００７／００１４２２（WO，Ａ１）
日本臨牀，２００４年，Vol.62，No.12，p.2323-2329
American Journal of Physiology. Lung Cellular And Molecular Physiology，２００５年，Vol.288，No.5，p.L958-L965
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine，２００１年，Vol.164，No.1，Part 1，p.1768-1773
Journal of Internal Medidine，２００４年，Vol.255，No.3，p.320-331
日本臨床麻酔学会誌，２００５年，Vol.25，No.3,，p.301-309
分子呼吸器病，２００６年，Vol.10，No.3，p.204-208

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ　　３９／３９５
Ｃ０７Ｋ　　１６／１８
ＣＡＰｌｕｓ／ＢＩＯＳＩＳ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩ）